



HEVs

haute école valaisanne
hochschule wallis
sciences de l'ingénieur

Filière Technologies du vivant
Orientation Chimie analytique

Diplôme 2006

Sonja Biner

*Caractérisation d'extraits aqueux
de "Rhodiola rosea"
en vue de leur utilisation
dans une boisson anti-stress*

Professeur

Frans Zonnevillje

Experte

Pia Malnoë



HEVs

Route du Rawyl 47
1950 Sion 2
haute école valaisanne
hochschule wallis

HES-HEVS-T (Sion)



EM000005224504

Sion, le 24 novembre 2006



Hes·SO

Haute Ecole Spécialisée
de Suisse occidentale
Fachhochschule Westschweiz
University of Applied Sciences
Western Switzerland

TV/ 2006 / 44

Caractérisation d'extraits aqueux de *Rhodiola rosea* en vue de leur utilisation dans une boisson anti-stress

Charakterisierung wässriger *Rhodiola rosea* Extrakten im Hinblick auf ihre Anwendung in einem anti-stress Getränk

Objectif

Un des buts de ce travail de diplôme était la caractérisation d'extraits aqueux de *Rhodiola rosea* à l'aide de différentes techniques chromatographiques. Un deuxième but était également la comparaison de l'extraction aqueuse à l'extraction hydro alcoolique. Encore un autre but était la comparaison de racines de différentes provenances ainsi que l'analyse de parties aériennes de *Rhodiola rosea*.

Résultats

À l'aide des spectres de masse quatre principes actifs, à savoir la salidroside, la rosarine, la rosavine et le cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside ont été identifiés.

Entre l'extraction par solvants accélérés à l'eau et hydro alcoolique il n'y a aucune différence. Avec les deux méthodes les substances intéressantes sont extraites avec la même efficacité.

La macération à l'eau et à température ambiante par contre montre un taux de recouvrement très faible et n'est donc pas profitable. Il faut procéder à une optimisation.

En ce qui concerne les teneurs en actifs des différentes plantes, on peut dire que le rhizome du Mattmark et le rhizome du Binntal 38 sont les plantes avec le potentiel d'utilisation le plus intéressant.

La racine du Mattmark contient 3.5%PS (plante sèche) de salidroside, 0.6%PS de rosarine, 2.0%PS de rosavine et 420ppmPS de cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside.

Le rhizome du Binntal 38 contient 0.6%PS de salidroside, 0.7%PS de rosarine, 2.5%PS de rosavine et 610ppmPS de cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside.

Mots-clés

Rhodiola rosea, adaptogène, HPLC/MS, ASE, extraction aqueuse, rosavine, rosarine, salidroside

Ziel

Eines der Ziele dieser Diplomarbeit war die Charakterisierung wässriger *Rhodiola rosea* Extrakten mit Hilfe verschiedener chromatographischen Techniken. Ein zweites Ziel war der Vergleich zwischen wässriger Extraktion und hydroalkoholischer Extraktion. Weitere Ziele waren sowohl der Vergleich von Wurzeln verschiedener Herkunft als auch die Untersuchung der Luftpartien von *Rhodiola rosea*.

Resultate

Mit Hilfe von Massenspektren konnten vier Inhaltsstoffe identifiziert werden. Dies sind Salidroside, Rosarin, Rosavin und Cinnamyl-(6'-O- β -xylopyranosyl)-O- β -glucopyranosid.

Zwischen der wässrigen und hydroalkoholischen beschleunigten Lösungsmittel Extraktion besteht kein Unterschied. Mit beiden Methoden konnten die gewünschten Substanzen mit gleicher Wirksamkeit extrahiert werden.

Durch Rührung in Wasser und bei Raumtemperatur wird extrem wenig extrahiert und ist deshalb nicht profitabel. Es muss eine Optimierung durchgeführt werden.

Was die Gehälter an aktiven Stoffen der verschiedenen Pflanzen angeht, so sind das Rhizom aus dem Mattmark und jenes aus dem Binntal mit der Nummer 38 am interessantesten.

Die Wurzel aus dem Mattmark enthält 3.5%GP (getrocknete Pflanze) Salidroside, 0.6%GP Rosarin, 2.0%GP de Rosavin und 420ppmGP Cinnamyl-(6'-O- β -xylopyranosyl)-O- β -glucopyranosid.

Das Rhizom aus dem Binntal 38 enthält 0.6%GP Salidroside, 0.7%GP Rosarin, 2.5%GP Rosavin und 610ppmGP Cinnamyl-(6'-O- β -xylopyranosyl)-O- β -glucopyranosid.

Schlüsselwörter

Rhodiola rosea, adaptogen, HPLC/MS, ASE, wässrige Extraktion, Rosavin, Rosarin, Salidroside

Table des matières

1. Introduction.....	2
2. Partie théorique	3
2.1. Le terme adaptogène	3
2.2. Définition du terme stress	3
2.3. Le modèle de stress selon Selye	4
2.4. <i>Rhodiola rosea</i> en générale	5
2.5. Phytochimie de <i>Rhodiola rosea</i>	6
2.5.1. Les principes actifs.....	8
2.6. Aspect pharmacologique / études cliniques	10
3. Partie expérimentale	11
3.1. Plan d'échantillonnage	11
3.2. Matériel.....	12
3.2.1. Extraction par solvants accélérés	12
3.2.2. Chromatographie sur couches minces.....	12
3.2.3. Chromatographie liquide haute performance à spectromètre de masse ou détecteur à barrette de diode	12
3.2.4. Macération.....	12
3.2.5. Dosage des tannins	13
3.3. Produits et toxicologie.....	13
3.3.1. Extraction par solvants accélérés	13
3.3.2. Chromatographie sur couches minces.....	13
3.3.3. Chromatographie liquide haute performance à spectromètre de masse ou détecteur à barrette de diode	14
3.3.4. Dosage des tannins	15
3.4. Méthodes	15
3.4.1. Séchage	15
3.4.2. Extraction par solvants accélérés	16
3.4.3. Détermination de la matière sèche	16
3.4.4. Chromatographie sur couches minces.....	16
3.4.5. Détermination de l'acide rosmarinique	18
3.4.6. Analyse des extraits de <i>Rhodiola rosea</i>	18
3.4.7. Macération.....	19
3.4.8. Dosage des tannins	19

4. Résultats et discussion	20
4.1. Extraction à différents pH	20
4.2. Optimisation de la méthode HPLC-MS	21
4.3. Caractérisation des extraits bruts de racine	22
4.3.1. Identification de principes actifs à l'aide de spectre de masse.....	22
4.3.2. Détermination qualitative de famille de substance par chromatographie sur couche mince.....	25
4.3.3. Quantification des principes actifs	26
4.3.4. Macération.....	31
4.3.5. Identification de la perturbation sur les chromatogrammes.....	32
4.3.6. Observation générale sur les extraits de <i>Rhodiola rosea</i>	34
4.4. Analyse d'extraits de feuilles	35
5. Conclusions et perspectives.....	36
6. Bibliographie	37

1. Introduction

Le physicien Grec Dioscoride a reporté pour la première fois des applications médicales de *rodia riza* en 77 après Jésus Christ, dans son ouvrage *De Materia Medica*. Linnaeus la renomma en *Rhodiola rosea* du a l'odeur similaire à celle de la rose, dégagée par les racines fraîchement coupées.¹



Figure 1: Photo de *Rhodiola rosea*²

Durant des siècles *Rhodiola rosea* a été utilisée dans la médecine traditionnelle en Russie, Scandinavie et d'autres pays. Entre 1725 et 1960 différentes applications médicales apparaissent dans la littérature scientifique de Suède, Norvège, France, Allemagne, Union Soviétique et Islande. Depuis 1960 plus de 180 études pharmacologiques, phytochimiques et cliniques ont été publiées. Même que *Rhodiola rosea* ait été largement étudiée comme adaptogène (c.f. 2.1), ses propriétés sont que peu connues dans l'est. Ceci est en partie du au fait que la majorité des publications est en langues slaves ou scandinaves.¹

La médecine traditionnelle populaire utilisait *R. rosea* pour améliorer l'endurance physique, la productivité de travail, la résistance contre le mal d'altitude ainsi que contre la fatigue, les dépressions, l'anémie, l'impuissance, les infections et les troubles du système nerveux.¹

Plus récemment il a été démontré que *Rhodiola rosea* possède aussi des activités anti hypoxiques, anti oxydantes, anti cancer de prostate et anti bactérienne, anti hépatiques et le pouvoir d'améliorer l'apprentissage et la mémoire.³

En 1961 il a été prouvé par des chercheurs russes, que les extraits de *R. rosea* contiennent des adaptogènes performants. La recherche de nouvelles médecines pour le traitement de maladies comme le cancer et la recherche d'augmenter la performance physique et mentale ont mené à la découverte d'un groupe de phénylepropanoïdes (c.f. 2.5) spécifiques à *R. rosea*.¹

Rhodiola rosea pousse surtout en altitude dans les régions arctiques et montagneuses à travers l'Europe et l'Asie.⁴ C'est pourquoi l'Agroscope Changins-Wädenswil (ACW) voit du potentiel de mise en culture de *R. rosea* en Valais, plus particulièrement dans le Haut-Valais (Binntal et Mattmark). Pour cette raison différentes racines sont analysées durant le travail afin de déterminer quelle « route » prendre au futur.

On pourrait imaginer une multitude d'applications pour des extraits de *R. rosea*. Le plus souvent il s'agit d'extraits hydro alcoolique, mais pour certaines applications, comme par exemple la création d'une boisson, il est avantageux de travailler avec des extraits purement aqueux. C'est pourquoi ces analyses sont réalisées durant ce travail.

2. Partie théorique

2.1. Le terme adaptogène

Le terme adaptogène a été créé en 1947 par le pharmacologiste russe N. V. Lazarev pour décrire l'effet inattendu du dibazol[®] (2-benzylebenzimidazol), un dilatateur artériel développé en France. Durant des études expérimentales le dibazol[®] s'est avéré augmenter la résistance des organismes contre le stress.

Le mot adaptogène se compose du mot latin *adaptare* qui signifie ajuster et du mot grec *genes* qui signifie né de ou produit par.

Pour qu'une drogue soit considérée comme adaptogène elle doit remplir les trois conditions de la définition du terme adaptogène : ⁵

- L'effet adaptogénique est non-spécifique dans le sens qu'il augmente la résistance contre un large domaine de facteurs nocifs de nature physique, chimique et biologique différente.
- Un adaptogène possède un effet normalisant c'est-à-dire qui compense ou empêche les troubles causés par des facteurs de stress.
- Un adaptogène doit couvrir un large domaine d'effet thérapeutique mais sans troubler le fonctionnement normal de l'organisme.

Les adaptogènes constituent une nouvelle classe de régulateurs métaboliques (d'origine naturelle) qui permettent à l'organisme de mieux s'adapter aux facteurs environnementaux et d'en éviter des dommages. ⁵

Des chercheurs russes ont catégorisé *Rhodiola rosea* comme adaptogène due à l'augmentation de la résistance contre des facteurs de stress chimiques, biologiques et physiques.

2.2. Définition du terme stress

Par stress on entend un état d'autorégulation (homéostasie) dérangé. Cet état est caractérisé par un syndrome spécifique et est déclenché par des impulsions (facteur de stress) non spécifiques. Les facteurs de stress sont des influences d'origine physique ou psychique auxquels l'organisme n'est pas suffisamment adapté comme par exemple des blessures, des opérations, des intoxications, l'exposition à du rayonnement, la pression psychique ou la peur. Ils mènent à un dérangement du « steady state » de l'organisme. ⁶

2.3. Le modèle de stress selon Selye

Dans le paragraphe suivant un petit aperçu abrégé du modèle de stress selon Selye est donné.

Selye a décrit les réactions non spécifiques d'un organisme à l'exposition au stress et les résume sous le terme de « syndrome d'adaptation général ». Le syndrome d'adaptation général, qui selon Selye se manifeste indépendamment du facteur de stress le causant, est divisé en trois phases.⁶

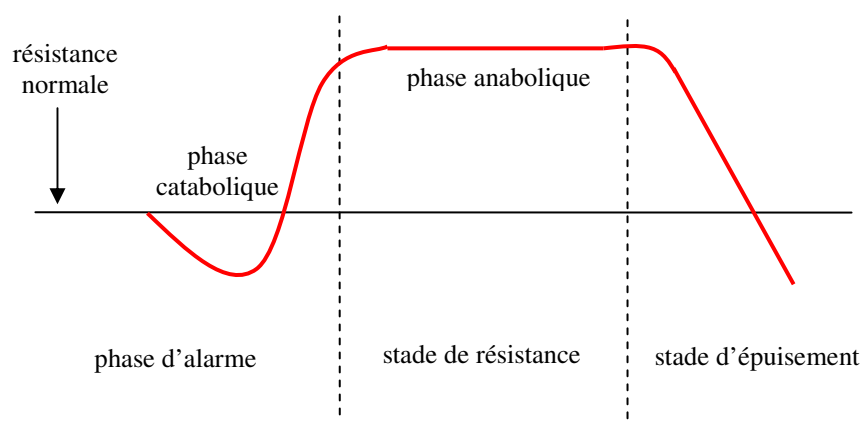


Figure 2: Résistance spécifique de l'organisme durant les trois phases du syndrome d'adaptation générale⁶

- **Phase d'alarme**

La phase d'alarme constitue la réaction instantanée de l'organisme envers le stress. Selye a observé des changements, qui étaient toujours de la même nature et de ce fait indépendant du genre de l'agent destructeur (froid, chaleur, toxiques, interventions chirurgicales etc.).

L'organisme se trouve en phase de métabolisme catabolique. La force de résistance générale non spécifique est augmentée.⁶

- **Stade de résistance**

Sous influence répétée ou chronique sur plusieurs jours d'un facteur de stress, la deuxième phase du syndrome d'adaptation générale, appelée stade de résistance, se manifeste. L'organisme développe maintenant selon le facteur de stress une sorte d'habitude ou d'adaptation et peut de cette façon résister au facteur de stress.

La phase de métabolisme catabolique de la phase d'alarme est remplacée par des fonctions anaboliques. Au lieu d'une résistance générale non spécifique augmentée, il y a maintenant une résistance spécifique au facteur de stress.⁶

- **Stade d'épuisement**

La force de résistance d'un organisme n'est pas illimitée. Si la pression dépasse une certaine limite ou durée, la phase d'épuisement est atteinte. Selye a observé que celle-ci amène les mêmes dommages d'organe que la phase d'alarme mais mène cette fois-ci à la mort des animaux.⁶

D'après cette division un effet adaptogénique peut se manifester de différente façon :⁶

- 1.) Oppression de la phase d'alarme
- 2.) Prolongation du stade de résistance (phase d'adaptation)
- 3.) Retardation ou diminution de la phase d'épuisement

2.4. *Rhodiola rosea* en générale

Rhodiola rosea aussi connue sous le nom d'orpin rose ou « racine d'orée » appartient à la famille des crassulacées. C'est une plante résistante avec un rhizome épais qui sent fortement lorsque qu'on le coupe. Elle peut atteindre une hauteur de 70cm et produit des fleurs jaunes.

Les différentes espèces du genre *Rhodiola* sont distribuées dans les régions montagneuses des latitudes nordiques et les élévations de l'hémisphère nord. Au centre et au nord de l'Asie le genre est distribué depuis le massif de l'Altaï, à travers la Mongolie jusqu'en Sibérie.¹

Selon G. Hegi, la distribution en Europe s'étend depuis l'Islande et les Iles Britanniques à travers la Scandinavie et allant au sud jusqu'aux Pyrénées, les Alpes, les Carpates et autres régions montagneuses du Balkan.¹

Quelques espèces ont été identifiées en Alaska, au Canada et dans les montagnes du nord des Etats-Unis.¹

Rhodiola rosea produit un énorme rhizome à l'apparence d'un tubercule. Seules quelques fines racines sont présentes.

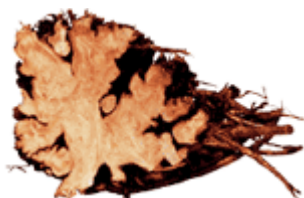


Figure 3: Photo d'un rhizome de *Rhodiola rosea* avec quelques fines racines au bord⁷

Quand on enlève la première couche, le cylindre central possède une couleur jaune caractéristique. Lorsqu'on le sèche prudemment, les surfaces de coupe deviennent roses.⁶

Le statut taxonomique du genre *Rhodiola* est devenu complexe. Avant la seconde guerre mondiale quelques taxonomistes regroupaient différentes espèces de *Rhodiola* dans un genre indépendant appartenant à la sous-famille des *Sedoideae*. Plus tard *Rhodiola* fut reclassé en tant que sous-genre du genre *Sedum*. En 1963 Hegi a identifié plus de 50 espèces de *Rhodiola* et les a ré-établis comme genre appart. Du à leur similarités morphologiques elles forment un groupe *Rhodiola* distinct. Mais encore Aujourd'hui les opinions des spécialistes diffèrent sur la question : « quelles nouvelles espèces doivent être attribuées au genre *Rhodiola* ? ». ¹

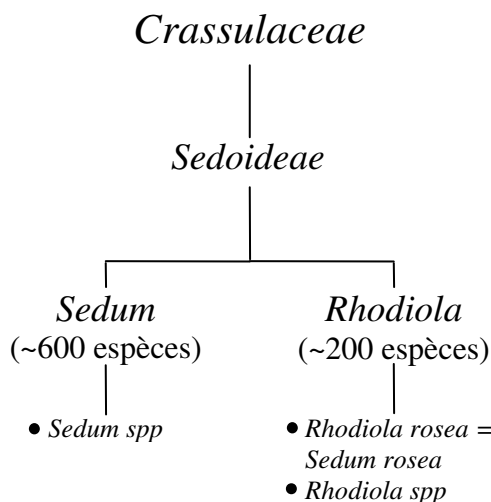


Figure 4: Aperçu de la taxonomie de *Rhodiola rosea*⁸

Les propriétés pharmacologiques et médicales dépendent de l'espèce de *Rhodiola*. De toutes les espèces, *Rhodiola rosea* a été le sujet prédominant d'études phytochimiques, animales et humaines. A peu près 51% des études animales et 94% des études humaines conduites sur le genre *Rhodiola* ont été effectuées sur *R. rosea*. Seul *Rhodiola rosea* a passé maintes études toxicologiques et a été certifiée comme non dangereuse pour les animaux et les humains. ¹

2.5. Phytochimie de *Rhodiola rosea*

Une multitude de substances ont déjà été identifiées comme composant de *Rhodiola rosea* par des chercheurs à travers le monde.

Un aperçu de ces composés est reporté dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1: Aperçu des composants connus de *Rhodiola rosea*

famille	nom du composé	nom commun / synonyme	formule	MM* [g/mol]	réf.
dérivé de phényleéthanol	2-[4-hydroxyphényle]-éthanol-1- O-β-glucopyranoside	salidroside, rhodioloside	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	300	9
	2-[4-hydroxyphényle]-éthanol	p-tyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	138	10

phényle- propanoïde	cinnamyle-O-β-glucopyranoside	rosine	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296	9
	cinnamyle-(6'-O-α-arabinofuranosyle)-O-β-glucopyranoside	rosarine	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₀	428	9
	cinnamyle-(6'-O-α-arabinopyranosyle)-O-β-glucopyranoside	rosavine, rosavidine	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₀	428	9
	4-hydroxycinnamyle-O-β-glucopyranoside	triandrine, sachaliside 1	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312	9
	4-methoxycinnamyle-O-β-glucopyranoside	vimaline	C ₁₆ H ₂₂ O ₇	326	9
	benzyle-O-β-glucopyranoside	-	C ₁₃ H ₁₈ O ₆	270	9
	cinnamyle-(6'-O-β-xylopyranosyle)-O-β-glucopyranoside	-	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₀	428	9
	4-methoxycinnamyle-(6'-O-α-arabinopyranosyle)-O-β-glucopyranoside	-	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₁	458	9
alcool cinnamylique		-	C ₉ H ₁₀ O	134	10
flavanolignane		rhodioline			10
flavonoïde	herbacétine	-	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302	13
	herbacétine-7-O-α-L-rhamnopyranoside	rhodionine	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448	13
	herbacétine-7-O-α-L-rhamnopyranose-8-O-β-D-glucopyranoside	rhodionidine	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610	13
	herbacétine-8-O-β-D-xylopyranoside	rhodaline	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	434	13
	herbacétine-8-O-β-D-xylopyranose-3-O-β-D-glucopyranoside	rhodalidine	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	596	13
	herbacétine-(3'-β-D-glucopyranosyle)-7-O-α-L-rhamnopyranoside	rhodiosine, rhodioflavonoside ³	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610	13
	gossypétine	-	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318	13
	gossypétine-7-O-α-L-rhamnopyranoside	rhodioline	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464	13
	gossypétine-7-O-α-L-rhamnopyranose-8-O-β-D-glucopyranoside	rhodioline	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	626	13
	acétylherbaldine	-			10
8-méthyleherbacétine		-			10

	kampferol	-	$C_{15}H_{10}O_6$	286	13
	kampferol-7-O-rhamnoside	-	$C_{21}H_{20}O_{10}$	432	13
	tricine				10
	tricine-5-O-glucoside				10
	tricine-7-O-glucoside				10
tannin	catéchine	monomère constituant les procyanidines ¹⁵			14
	proanthocyanidines	tannins condensés qui appartiennent à la famille des flavonoïdes ¹⁵			14
composé phénolique	acide hydroxy-cinnamique	-	$C_9H_8O_3$	164	4
	acide gallique	-	$C_7H_6O_5$	170	10
	méthyle gallate	-	$C_8H_8O_5$	184	10
	éthyle gallate	-	$C_9H_{10}O_5$	198	12
	acide caféique	-	$C_{16}H_{18}O_9$	332	14
	acide chlorogénique	-	$C_9H_8O_4$	180	14
stérol	β -sitostérol	-	$C_{29}H_{50}O$	414	10
	sitostérol 3-O- β -D-glucopyranoside ¹⁰	daucostérol ⁹	$C_{35}H_{60}O_6$	576	10, 11
monoterpène	3,7-diméthyle-2,6-octadiène-1,4-diole	rosiridol	$C_{10}H_{18}O_2$	170	6
	(3,7-diméthyle-2,6-octadiène-1,4-diole)-1-O- β -glucopyranoside	rosiridine	$C_{16}H_{28}O_7$	332	6

* MM: masse molaire

Appart les composés mentionnés dans le tableau 1 encore 86 composants volatiles du rhizome de *Rhodiola rosea* ont été identifiés¹⁶. Ceux-ci peuvent être consultés à l'annexe 22 du classeur d'annexes²². Parmi ces composés le géraniol à été identifié comme composant principal de l'odeur similaire à celle de la rose¹⁶.

2.5.1. Les principes actifs

Les composés d'une plante munit d'un effet pharmacologique sont appelés principes actifs.

Les propriétés stimulantes et adaptogènes de *Rhodiola rosea* ont au tout début été attribué à deux composés isolés de la racine et identifiés comme p-tyrosol et rhodioloside. Plus tard il a été remarqué que le rhodioloside était identique au glycoside salidroside trouvé dans plusieurs autres espèces de plante.¹⁴



Figure 5: Structures du p-tyrosol (gauche) et de la salidroside (droite)

Les composés glycosides rhodioline, rosine, rosavine, rosarine et rosiridine sont aussi considérés critiques pour les propriétés adaptogéniques de la plante.¹⁴

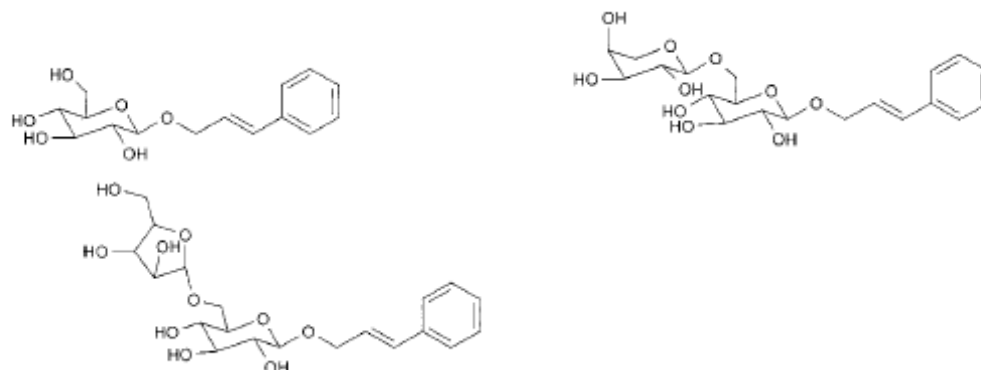


Figure 6: Structures de la rosine(en haut à gauche), de la rosavine (en haut à droite) et de la rosarine (bas)

Une rangée de composés antioxydant ont été identifié dans *R. rosea* dont le p-tyrosol, des acides organiques (acide gallique, acide caféique et chlorogénique) et des flavonoïdes (catéchines et proanthocyanidines).¹⁴

Selon Kurkin et al., la triandrine est considérée comme un des majeurs composés bioactif.¹⁷

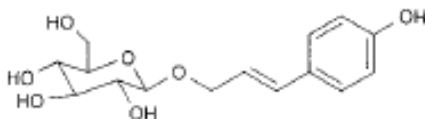


Figure 7: Structure de la triandrine

D'autres composés pharmacologiquement actifs sont la rhodionine et l'éthyle gallate.¹²

Encore une autre publication attribue de la bioactivité à la gossypétine-7-O- α -L-rhamnopyranoside et au rhodioflavonoside. Ces deux composés auraient une activité contre *Staphylococcus aureus* et une activité contre les cellules du cancer de la prostate.⁴

En général on peut dire que les phénylpropanoïdes sont en majorité responsables pour les propriétés adaptogéniques et les acides organiques et les flavonoïdes contribuent à l'activité antioxydante des extraits bruts de *Rhodiola rosea*.⁴

Un phénylepropanoïde non cité spécifiquement dans les publications comme étant bioactif mais qui a été identifié et quantifié durant ce travail de diplôme est le cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside.

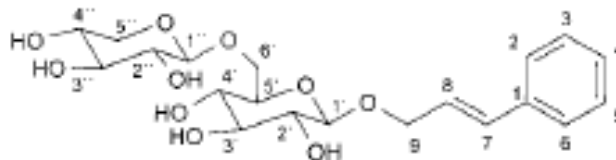


Figure 8: Structure du cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside

2.6. Aspect pharmacologique / études cliniques

La médecine traditionnelle populaire utilisait *R. rosea* pour améliorer l'endurance physique, la productivité de travail, la résistance contre le mal d'altitude ainsi que contre la fatigue, les dépressions, l'anémie, l'impuissance, les infections et les troubles du système nerveux.¹

Plus récemment il a été démontré que *Rhodiola rosea* possède aussi des activités anti hypoxiques, anti oxydantes, anti cancer de prostate et anti bactérienne, anti hépatiques et le pouvoir d'améliorer l'apprentissage et la mémoire.³

Jusqu'à aujourd'hui de nombreuses études concernant les propriétés pharmacologiques ont été faites tant sur des animaux que des humains.

Les effets les plus importants après des tests d'administration unique sur des humains, sont l'augmentation de la capacité de travail mental, de la capacité de travail physique, de l'exactitude du mouvement et des fonctions visuelles des yeux.¹⁸

Effets d'adaptogènes sur la capacité de travail mental

L'effet d'administration unique d'un extrait de *R. rosea* sur la performance mentale de 85 hommes et femmes en bonne santé, travaillant sous les mêmes conditions a été étudiée par Zotova (1965). Les sujets devaient biffer les lettres A et C dans un texte pendant 5min. Les sujets ont été partagés en groupe et chaque groupe a été traité séparément avec différentes doses d'extrait de *R. rosea* et un groupe avec du placebo. Chaque sujet a effectué deux fois la tâche. Une fois avant le traitement à l'extrait et une fois 1h après. Les résultats indiquent que comparé au traitement au placebo, l'application de *R. rosea* n'a pas d'effet sur la quantité de lettres correctement biffées mais réduit considérablement le nombre d'erreurs commises.¹⁸

Une étude un peu plus récente a été faite par Shevtsov et al. (2003). C'est une étude en double aveugle vs placebo afin de déterminer l'effet d'administration unique d'un extrait standardisé de *R. rosea* sur la capacité de travail mental en situation de fatigue et de stress. L'analyse portant sur 161 cadets démontre des effets significatifs anti-stress et anti-fatigue.¹⁸

Effets d'adaptogènes sur la capacité de travail physique

Dans une récente étude en double aveugle vs placebo de l'effet d'administration unique et répétée (durant 4 semaines) d'extraits standardisés de *R. rosea* sur la capacité physique, la force musculaire, temps de réaction etc. sur des jeunes volontaires, a montré une augmentation de l'endurance (De Bock et al., 2004).

Comparé au groupe traité avec du placebo la dose unique augmente significativement le temps jusqu'à l'épuisement tandis que l'administration répétée ne montre pas de différence significatives. Ceci est en contraste avec d'autres publications qui notaient un effet significatif sur la capacité mentale et physique après administration répétée d'extrait de *R. rosea* (Darbinyan et al., 2000 et Spasov et al., 2000a,b).¹⁸

Activité anti-acétylcholinestérase des extraits de *Rhodiola rosea*

Les extraits alcooliques de *R. rosea* montre une inhibition de l'acétylcholinestérase (AChE). Cette inhibition fournit une explication physiologique pour les effets observés sur l'augmentation de la mémoire et des capacités mentales. Une multitude de substances sont connectées à cette inhibition dont le gossypétine-7-O- α -L-rhamnopyranoside et le rhodioflavonoside.³

En vue de cette nouvelle activité enzymatique et des études réalisées auparavant concernant l'augmentation des capacités mentales, cette plante doit être analysée pour son potentiel dans le traitement des maladies de dégénération de la mémoire comme l'Alzheimer.³

3. Partie expérimentale

3.1. Plan d'échantillonnage

Des rhizomes, racines et feuilles de différents endroits ont été mis à disposition dans des sachets en papier brun par l'Agroscope-Changin-Wädenswil (ACW). Dans le tableau 2 ci-dessous un aperçu sur les « échantillons » ainsi que les abréviations utilisées sont reportées.

Tableau 2: Aperçu sur les plantes mises à disposition

	origine	« code » sur le sachet	quantité à disposition	abréviation
racine	Mattmark	racine Mattmark	8g	WuMa
racine	Mattmark	racine Mattmark sep 06	≈ 110g	WuMa Sep06
rhizome	Unteralp	RHO.06-70 U06-6	15g	RU70
rhizome	Unteralp	RHO.06-72 U06-8	15g	RU72
rhizome	Binntal	RHO.06-38 B06-6	20g	RB38
rhizome	Binntal	RHO.06-40 B06-8	12g	RB40
rhizome	Binntal	RHO.06-46 B06-14	15g	RB46
parties aériennes	Unteralp	feuilles d'Unteralp	?	fU
parties aériennes	Binntal	feuilles du Binntal	?	fB

3.2. Matériel

3.2.1. Extraction par solvants accélérés

- Matériel usuel de laboratoire
- Découpeur centrifuge ZM 100 avec tamis annulaire de diamètre 1.0mm (Retsch ; Haan bei Düsseldorf, Allemagne)
- Accelerated Solvent Extractor ASE 2000 (Dionex; Sunnyvale/CA, USA)
- Vials avec septum
- Cellules d' extraction

3.2.2. Chromatographie sur couches minces

- Matériel usuel de laboratoire
- Plaques chromatographiques en aluminium 20x20cm, gel de silice 60 F₂₅₄ (Merck ; Darmstadt, Allemagne)
- Chambre d'élution (CAMAG ; Muttenz, Suisse)
- Capillaire 1µl
- Centrifuge, Labofuge 200 (Heraeus sepatech ; Osterode/Harz, Allemagne)
- Balance analytique CP225D (Sartorius ; Göttingen, Allemagne)
- Applicateur de point, Linomat IV (CAMAG ; Muttenz, Suisse)
- Seringue, Linomat syringe 695.0014 (CAMAG ; Muttenz, Suisse)

3.2.3. Chromatographie liquide haute performance à spectromètre de masse ou détecteur à barrette de diode

- Matériel usuel de laboratoire
- Chromatographe, HPLC Series 1200 avec dégazeur, pompes, injecteur automatique, thermostat, diode array detector (DAD) et détecteur de fluorescence (FLD) (Agilent Technologies ; Palo Alto/CA, USA)
- Colonne; CC 125/3 NUCLEOSIL 100-3 C18 HD, n° de série : 1070352, Batch : 23710112 (Macherey-Nagel ; Düren, Allemagne)
- Seringue à usage unique de 2ml (CODRAN Medical ApS ; Rødby, Danemark)
- Filtre seringue 0.45µm GHP Acrodisc® (PALL, New York ; USA)
- Colonne pour la quantification de l'acide rosmarinique, CC250/4 Lichrospher 100 RP8 5µm, n° de série : 4040610 (Macherey-Nagel ; Düren, Allemagne)
- Chromatographe, HPLC Series 1100 avec dégazeur, pompes, injecteur automatique, thermostat, détecteur UV (Hewlett Packard ; Palo Alto/CA, USA)
- Spectromètre de masse, Series 1100 MSD (Hewlett Packard ; Palo Alto/CA, USA)

3.2.4. Macération

- Matériel usuel de laboratoire
- Toile filtrante (toile de fromager)
- Découpeur centrifuge ZM 100 avec tamis annulaire de diamètre 1.0mm (Retsch ; Haan bei Düsseldorf, Allemagne)
- Filtre à plaque FibraFix AF31H (Filtrox ; St. Gallen, Suisse)

3.2.5. Dosage des tannins

- Matériel usuel de laboratoire
- Distributeur à visser sur flacon Ceramus®classic 2-10ml et 5-30ml (Hirschmann Laborgeräte ; Eberstadt, Allemagne)
- Multipipette® (Eppendorf ; Hamburg, Allemagne)
- Combitips plus 25ml (Eppendorf ; Hamburg, Allemagne)
- Filtres plissés Ø 150mm (Schleicher&Schüll ; Allemagne)
- Spectrophotomètre, WPA Spectrawave S100 Diode Array Spectrophotometer (Biochrom; Cambridge, Royaume-Uni)

3.3. Produits et toxicologie

3.3.1. Extraction par solvants accélérés

Tableau 3: Produits utilisés pour l'extraction ASE et leur toxicité¹⁹

produit	formule	pureté	fournisseur	n° du produit	n° lot	remarques
éthanol	C ₂ H ₆ O	≥ 99.9%	Pharmacochimie SA Cortaillod	EC 200-578-6	06-1088	facilement inflammable
hydrogénophthalate de potassium	C ₈ H ₅ KO ₄	≥ 99.5%	Fluka	60360	1060357 30105509	-
dihydrogénophosphate de potassium	KH ₂ PO ₄	≥ 98.0%	Riedel-de Haën	04245	23300	-
phosphate de sodium dibasique anhydre	HNa ₂ PO ₄	≥ 99.0%	Fluka	71640	456488/1 23404267	hygroscopique
terre diatomée (Bulk Isolute Sorbent)	-	-		9800-1000	800-6-01	-

3.3.2. Chromatographie sur couches minces

Tableau 4: Produits utilisés pour la chromatographie sur couches minces et leur toxicité¹⁹

produit	formule	pureté	fournisseur	n° du produit	n° lot	remarques
toluène	C ₇ H ₈	≥ 99.3%	sds	07110T16	18060103	facilement inflammable; nocif en cas d'inhalation
acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂	≥ 99.0%	Fluka	45770	1195523 42705178	facilement inflammable; irrite les yeux
chloroforme	CHCl ₃	≥ 99.0%	Carlo Erba	ML2500	V3N140303N	nocif en cas d'ingestion ; dommage irréversible possible

éthanol	C ₂ H ₆ O	absolu	Lavanchy	TEC11825	-	facilement inflammable
acide acétique	C ₂ H ₄ O ₂	≥ 99.0%	Fluka	45740	-	inflammable; provoque de graves brûlures
acide formique	CH ₂ O ₂	98-100%	Riedel-de Haën	33015	51790	provoque de graves brûlures
diphénylborinate de 2-aminoéthyle	C ₁₄ H ₁₆ BNO	≥ 97.0%	Fluka	42810	1292688 32506101	ne pas respirer les poussières ; éviter le contact avec la peau et les yeux
acide sulfurique	H ₂ SO ₄	85%	sds	SO433/15	19060234	provoque de graves brûlures
vanilline	C ₈ H ₈ O ₃	≥ 99.0%	Fluka	94750	-	nocif en cas d'ingestion
géraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	≈ 96%	Fluka	48799	293596 690	irrite les yeux, les voies respiratoires et la peau
anisaldéhyde	C ₈ H ₈ O ₂	≥ 98.0%	Fluka	10440	291188 190	éviter le contact avec les yeux et la peau
acide chlorogénique	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	≥ 95.0%	Sigma	C3878-1G	104K0722	éviter le contact avec les yeux et la peau
umbelliférone	C ₉ H ₆ O ₃	≥ 98.0%	Fluka	93979	448159/1 32103188	irrite les yeux, les voies respiratoires et la peau

3.3.3. Chromatographie liquide haute performance à spectromètre de masse ou détecteur à barrette de diode

Tableau 5: Produits utilisés pour la chromatographie liquide et leur toxicité¹⁹

produit	formule	pureté	fournisseur	n° du produit	n° lot	remarques
acétonitrile	C ₂ H ₃ N	≥ 99.9%	Merck	1.00030.2500	1297130 620	facilement inflammable ; nocif par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion ; irritant pour les yeux
méthanol	CH ₄ O	≥ 99.8%	Merck	1.06018.2500	K36034718 619	facilement inflammable ; toxique : danger d'effets irréversible très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion
éthanol	C ₂ H ₆ O	≥ 99.9%	Pharmacochimie SA Cortaillod	EC 200-578- 6	06-1088	facilement inflammable
acide rosmarinique	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	≥ 97.0%	Fluka	44699	456976/1 44803293	irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau
acide formique	CH ₂ O ₂	98-100%	Riedel-de Haën	33015-	51790	provoque de graves brûlures

méthanol	CH ₄ O	≥ 99.9%	LabScan	C17C11X	1386/5	facilement inflammable ; toxique : danger d'effets irréversible très graves par inhalation, par contact avec la peau et par ingestion
alcool cinnamylique	C ₉ H ₁₀ O	≥ 97.0%	Fluka	96330	1212650 45205100	nocif par ingestion ; irrite les yeux
p-tyrosol	C ₈ H ₁₀ O ₂	≥ 99.5%	Fluka	79058	1263300 42906182	irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau
rosavine	C ₂₀ H ₂₈ O ₁₀	≥ 93.8%	Chromadex	00018365	18365- 05182006	-
salidroside	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	≥ 99.0%	Chromadex	00019550	19550-116	-

3.3.4. Dosage des tannins

Tableau 6: Produits utilisés pour le dosage des tannins et leur toxicité¹⁹

produit	formule	pureté	fournisseur	n° du produit	n° lot	remarques
réactif de phénol de Folin-Ciocalteu	-	-	Fluka	47641	1149808 25204005	irrite les yeux et la peau
carbonate de sodium monohydrate	Na ₂ CO ₃	≥ 99.5%	Riedel- de Haën	13568	4033A	irrite les yeux
poudre de peau	-	-	-	-	-	-
pyrogallol	C ₆ H ₆ O ₃	≥ 99.0%	Sigma-Aldrich	254002-10G	10323HB	nocif par inhalation, par ingestion et par contact avec la peau ; nocif pour les organismes aquatiques

3.4. Méthodes

3.4.1. Séchage

Les feuilles mises à disposition étaient fraîches et conservées à -80°C. De ce fait elles doivent être séchées avant utilisation. Le séchage s'est effectué à 40°C à l'étuve pendant 8 jours.

Les racines du Mattmark récoltées en septembre 2006 sont découpées avec un sécateur et ensuite séchées à 45°C à l'étuve pendant 3 jours.

3.4.2. Extraction par solvants accélérés

Avant de pouvoir effectuer l'extraction les racines (ou feuilles) sont découpées à l'aide du découpeur centrifuge. Pour les racines, le diamètre de choix est de 1mm. Avant d'utiliser le découpeur centrifuge, les racines sont pré-coupées à l'aide d'un sécateur.

Les cellules d'extractions sont remplies avec un mélange le plus homogène possible d'environ exactement 3g de plante découpée et 7g de terre diatomée (bulk).

Pour l'extraction par solvants accélérés (ASE) la méthode standard est utilisée. Celle-ci est reportée dans le tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7: paramètres standards de l'extraction par solvants accélérés

pré chauffage (preheat)	0min
pression (pressure)	100bar
temps de chauffe (heat)	5min
température d'extraction (temperature)	40°C
temps d'extraction (static)	10min
volume de rinçage (flush%)	60%
temps de purge à l'azote (purge)	60s
nombre de cycle (cycle)	1

3.4.3. Détermination de la matière sèche

La matière sèche de la plante est déterminée en pesant environ exactement 3g de plante dans un cristalliseur et en laissant sécher le tout à l'étuve à 105°C pendant une nuit.

La matière sèche d'un extrait est déterminée en pesant 5ml (ou selon la quantité d'extrait 2ml) d'extrait dans un cristalliseur et en laissant sécher le tout à l'étuve à 105°C pendant une nuit.

3.4.4. Chromatographie sur couches minces

La présence de trois familles, à savoir les terpènes, les coumarines et les flavonoïdes, est déterminée par chromatographie sur couche mince (CCM). Pour ce faire, plusieurs éluants sont testés. Ci-dessous, que les méthodes finalement appliquées sont mentionnées. Pour des détails ultérieurs voir sous 4.3.2 dans la partie résultats et discussion.

Toutes les CCM sont effectuées sur des plaques de gel de silice en aluminium et les points sont appliqués avec le linomat de CAMAG. Les extraits brutes sont appliqués non-dilué après filtrage avec un filtre seringue.

Comme standards terpéniques des solutions d'environ 3% massique de géraniol et d'anisaldéhyde dans du toluène sont utilisées. Comme standard de coumarine une solution d'environ 0.1% m/m d'umbelliférone dans du méthanol est utilisée et comme standard d'acide phénolique une solution d'environ 0.05% m/m d'acide chlorogénique dans du méthanol est utilisée²¹.

Flavonoïdes / coumarines

éluant²¹ :

acétate d'éthyle	100
acide formique	11
acide acétique	11
eau	27

révélation : Après élution la plaque est séchée à 80°C pendant 15min. La plaque encore chaude est alors sprayée avec une solution de Naturstoffreagenz (diphénylborinate de 2-aminoéthyle) d'après Neu²⁰ et tout de suite après avec une solution de PEG-6000 5% m/m dans de l'éthanol pour renforcer et stabiliser la fluorescence. La plaque est ensuite séchée pendant 30min à température ambiante. La révélation se fait à 366nm.²⁰

préparation du révélateur : 1g de diphénylborinate de 2-aminoéthyle sont dissolu dans 100ml de méthanol.²⁰

volume d'application :

extraits :	20µl
standards terpènes :	3µl
standard coumarine :	10µl
standard acide phénolique :	10µl

Huiles essentielles

Éluant²¹ :

chloroforme	94
éthanol	5
acide acétique	1

révélation : Après élution la plaque est séchée avec un sèche-cheveux et refroidie. La plaque est alors sprayée avec une solution d'acide sulfurique à 5% m/m dans de l'éthanol et tout de suite après avec une solution de vanilline à 5% m/m dans de l'éthanol. La plaque est ensuite posée sur une plaque chauffante à 110°C pour faire apparaître les spots²¹. La révélation se fait donc dans le visible.

volume d'application :

extraits :	20µl
standards terpènes :	3µl
standard coumarine :	10µl
standard acide phénolique :	10µl

3.4.5. Détermination de l'acide rosmarinique

Pour la détermination de l'acide rosmarinique dans les feuilles une procédure standard est appliquée.

Une extraction hydro alcoolique (30% m/V éthanol dans de l'eau) avec les paramètres standards (cf. 3.4.2) est effectuée sur les feuilles.

10ul d'extrait hydro alcoolique non-dilué filtré avec filtre seringue est injecté dans l'HPLC avec DAD.

La température n'est pas contrôlée et le flux de l'éluant est de 1ml/min. Les conditions de gradient initiales sont 85%C (acide formique 0.5%)-15%D (méthanol). Celles-ci changent linéairement à 65%C-35%D en 20min. Pendant 12min le gradient ne change pas. Ensuite il passe à 55%C-45%D en 3min et ensuite à 30%C-70%D en 15min et finalement à 20%C-80%D en 2min. Durant 5min la colonne est équilibrée aux conditions initiales. Ceci donne un temps d'analyse de 57min. Les signaux à 340nm et 270nm sont enregistrés ainsi que leurs spectres respectifs de 200nm à 600nm. Pour plus de détails sur la méthode l'annexe 20 du classeur d'annexes²² peut être consultée.

Avec un standard d'acide rosmarinique une courbe de calibration est faite. Une solution mère $\approx 1000\text{mg/l}$ dans de l'éthanol est préparée pour ensuite faire des dilutions à l'eau déminéralisée.

La courbe de calibration comprend les 5 points suivants : 250mg/l, 125mg/l, 62.5mg/l, 31.25mg/l et 15.625mg/l

3.4.6. Analyse des extraits de *Rhodiola rosea*

Les analyses des extraits se sont effectuées en un premier temps par chromatographie liquide à haute performance couplé à un spectromètre de masse (HPLC-MS) pour identifier les principes actifs et en un deuxième temps par HPLC avec un DAD pour quantifier les principes actifs.

Avant de pouvoir analyser les extraits une optimisation « abrégée » a été effectuée due au facteur de temps. C'est-à-dire que seul un paramètre (le gradient) est modifié. Tous les autres paramètres restent constants durant toute la durée du travail de diplôme. Seules les méthodes optimisées sont mentionnées ci-dessous. Les détails pour chaque méthode sont consultables à l'annexe 20 du classeur d'annexes²².

Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La température du four est de 35°C et le flux de l'éluant est de 0.5ml/min et le volume d'injection est 20 μl . Les conditions initiales de gradient sont 95%A (eau milliQ)-2.5%B (acétonitrile)-2.5%D (méthanol). Celles-ci changent linéairement à 80%A-10%B-10%D en 20min. Ensuite il passe à 74%A-13%B-13%D en 5min et ensuite à 50%A-25%B-25%D en 30min. À la fin les conditions initiales sont rétablies et maintenue pendant 5min afin d'équilibrer à nouveau la colonne. Ceci mène à un temps d'analyse de 62min.

Dans le cas du couplage au spectromètre de masse la longueur d'onde utilisée du détecteur UV est 250nm.

Dans le cas du DAD les signaux à 250nm et 220nm sont enregistrés ainsi que leurs spectres respectifs de 210nm à 400nm (RHOD_PLAT.M).

Spectrométrie de masse (MS)

Le mode d'ionisation est l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Le spectre est enregistré sur un domaine de m/z de 120 à 900 en mode négatif avec un fragmenteur de 80V. Le nitrogène est utilisé comme gaz de séchage avec un flux de 4.5 l/min. Pour tous les autres détails sur la méthode (RHOD50N.M) l'annexe 20 du classeur des annexes²² est à consulter.

3.4.7. Macération

La racine est découpée à 1mm avec le découpeur centrifuge Retsch.

Dans un rapport de 1:8 la plante et le solvant sont mis dans un bécher avec un agitateur magnétique. La macération s'effectue à température ambiante avec une agitation très lente.

Pour déterminer la cinétique des principes actifs, après chaque heure 20ml de mélange sont prélevés et filtrés sur filtre à plaques. 1ml de filtrat est utilisé pour faire de l'HPLC et 2ml sont utilisés pour déterminer la matière sèche. Le marc ainsi que le filtrat qui est en trop sont reversés dans le bécher.

Au bout de 6 heures tout le mélange est versé gentilement sur une toile filtrante supportée d'un entonnoir. Le marc est pressé le mieux possible et transféré dans le bécher. Maintenant 20% du solvant de départ sont ajoutés et le mélange est agité lentement pendant 1 heure encore. Après 1 heure le mélange est reversé sur la toile filtrante et représsé. A ce point le marc est jeté. Le filtrat est filtré sur filtre à plaque et le filtrat ainsi obtenu est l'extrait brut et est stocké au frigo.

3.4.8. Dosage des tannins

Le dosage des tannins se fait d'après la méthode de la pharmacopée européenne avec comme seul changement l'utilisation de filtre plissé d'un diamètre de 150mm au lieu de 125mm.

Puisque la quantité d'extrait fluide prescrite (cf. paragraphe 2 du dosage des tannins dans la pharmacopée européenne) est inconnue, la quantité d'extrait brut correspondant à 0.5g de matière sèche est utilisée pour être compléter à 250ml.

Une copie de la méthode se trouve à l'annexe 20 dans le classeur des annexes²².

4. Résultats et discussion

4.1. Extraction à différents pH

Après une première optimisation de la méthode d'analyse HPLC il a été décidé d'effectuer des extractions ASE à différents pH afin de déterminer s'il existe un pH d'extraction optimal et pour éventuellement simplifier l'identification des substances présentes dans l'extrait.

Pour ce faire il faut en un premier pas mesurer le pH d'un extrait aqueux pour ensuite faire des extractions avec des tampons de $\text{pH} \pm 1.5$ unité de pH.

Puisque les plantes proviennent de 3 endroits différents le pH des extraits aqueux bruts a été mesuré pour chacun d'entre eux. Les pH mesurés des trois extraits sont reportés dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8: pH des extraits aqueux bruts

extrait	pH
WuMa 1.1	5.196
RU70 1.1	5.471
RB38 1.1.2	5.725

Puisque les trois valeurs sont proches, l'extraction avec les tampons a été effectuée que sur une plante.

Dans les extractions de plante on ne descend jamais en dessous de pH4, c'est pourquoi un des tampons est à pH4. Pour être sûr que tous les acides sont déprotonés le deuxième tampon possède un pH de 7. Les tampons ont été faits d'après le LabTools de Merck. Le tampon à pH4 a été fait d'hydrogénophthalate de potassium et celui à pH7 à partir de dihydrogénophosphate de potassium et de phosphate de sodium dibasique anhydre.

Pour pouvoir comparer l'efficacité de l'extraction aux différents pH on a regardé le rapport entre l'aire du pic à 250nm et la matière sèche en gramme. Plus le rapport est grand plus l'extraction est meilleure. Au moment de cette analyse l'identification des composés n'était encore pas faite. C'est pourquoi la substance avec un temps de rétention $\approx 21.7\text{min}$ a été prise pour faire les rapports. Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9: Aperçu des résultats de l'extraction à différents pH

échantillon	Aire du pic [mAU*s]	facteur de dilution [-]	m mél [g]	matière sèche [%]	matière sèche [g]	rapport Aire/MS* [mAU*s/g]
RB38 1.1.2	1747.76	20	40.057	2.78	1.11	31365
RB38 pH 7	1763.11	20	39.866	3.57	1.42	24776
RB38 pH 4	1643.93	20	40.760	3.68	1.50	21906

En regardant le rapport on voit que le plus grand rapport a été obtenu avec de l'eau déminéralisée. On en conclut donc que les extractions avec un pH plus haut ou plus bas n'apportent pas d'amélioration significative. Ou dans le cas de la substance à $\approx 21.7\text{min}$ apporte même une forte diminution de l'efficacité de l'extraction.

En ce qui concerne l'identification des substances, les spectres de masse et chromatogrammes à 250nm étaient plus ou moins identiques et de ce fait ne constituaient pas une grande aide.

4.2. Optimisation de la méthode HPLC-MS

La méthode publiée par A. Tolonen et al.⁹ a servi de méthode de base pour ce travail et peut être consultée à l'annexe 20 dans le classeur des annexes²². Le détecteur UV de l'HPLC-MS ne peut détecter qu'une seule longueur d'onde à la fois. Puisque aucune longueur d'onde n'était indiquée dans la publication il a tout d'abord fallu faire une analyse sur le DAD avec le gradient indiqué dans la littérature. Grâce au DAD il est possible d'enregistrer un spectre complet de chaque pic détecté à 254nm et comme ça trouver le maximum d'absorption des substances. Il s'est avéré que 250nm est la longueur d'onde de choix à appliquer sur l'HPLC-MS.

La séparation en HPLC avec le gradient de la publication était très mauvaise. Alors on a procédé à une optimisation du gradient. Le rapport 1:1 entre l'acétonitrile et le méthanol a été maintenu durant toute l'optimisation. On a surtout joué sur l'augmentation moins radicale du gradient ce qui a mené à un prolongement important de la méthode. Au final on est arrivé à la méthode décrite sous 3.4.6. Ci-dessous la différence de séparation est illustrée.

WuMa 1.1 signifie que c'est la première extraction aqueuse faite avec la racine du Mattmark et WuMa 2.1 signifie que c'est la deuxième, c'est-à-dire qu'elle a été effectuée plus tard.

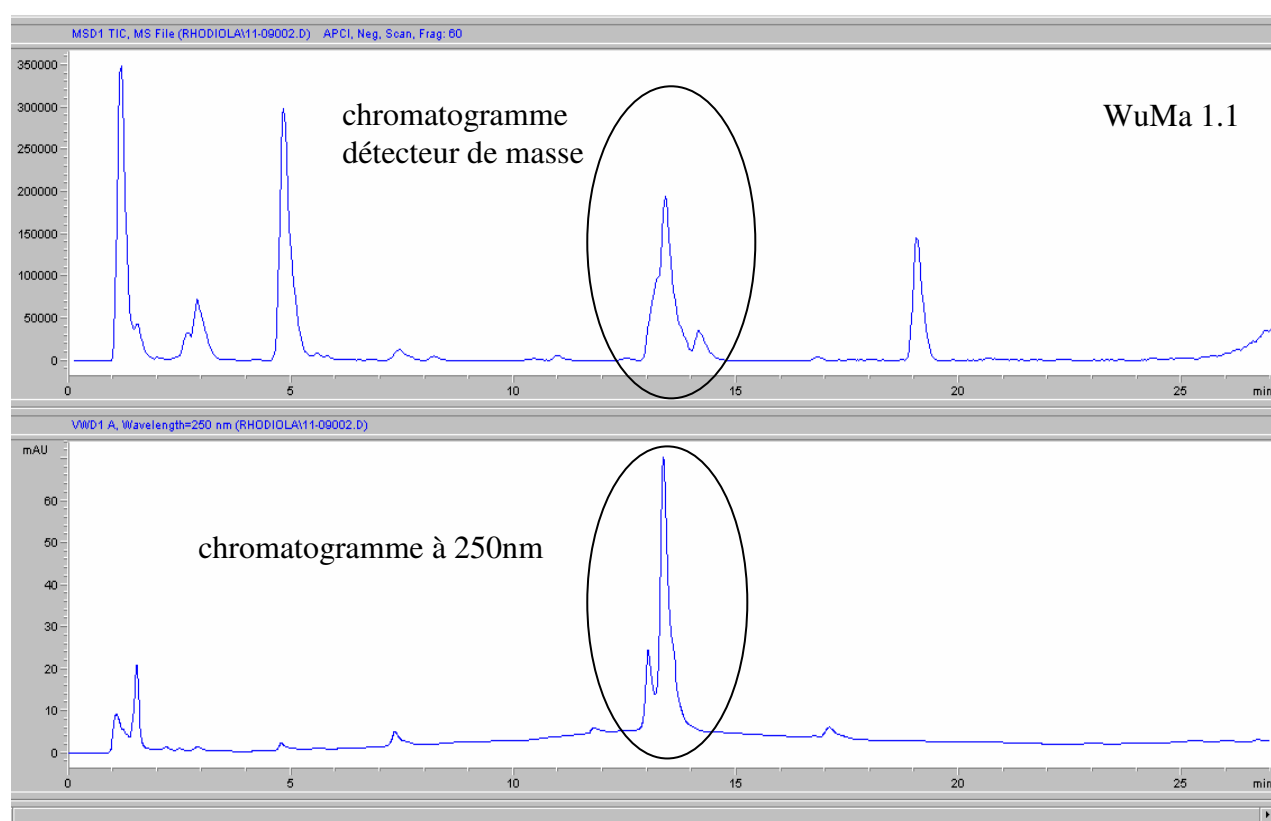


Figure 9: Chromatogrammes UV et MS avant l'optimisation de la séparation

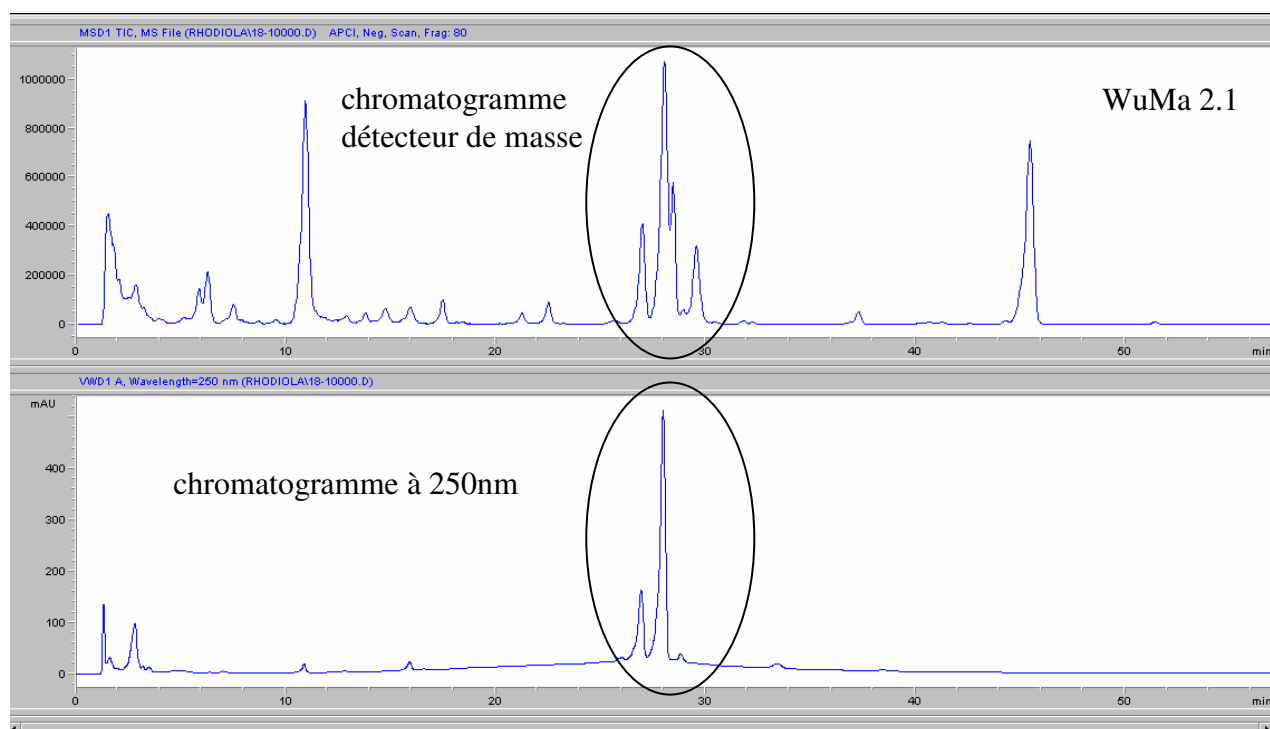


Figure 10: Chromatogrammes UV et MS après l'optimisation de la séparation

La prolongation de la méthode de 40min n'est certainement pas idéale. Il faudrait procéder à une optimisation complète de la méthode, c'est-à-dire qu'il faudrait commencer par trouver un éluant idéal par exemple à l'aide du triangle de Snyder, jouer sur la colonne (longueur, diamètre des particules etc.), sur la température etc.

4.3. Caractérisation des extraits bruts de racine

Tout le travail de diplôme s'est effectué sur des extraits bruts, c'est pourquoi la caractérisation des extraits s'est avérée très difficile. Le fait que les plantes constituent une matrice très complexe mène à des problèmes et des challenges qu'il reste encore à résoudre.

4.3.1. Identification de principes actifs à l'aide de spectre de masse

Les chromatogrammes UV et MS des différentes plantes ne se différenciaient pas énormément. C'est pour cette raison que l'identification a été faite que sur un chromatogramme MS. Des 25 pics à identifier seul 4 ont été identifiés avec certitude. Ci-dessous le chromatogramme MS complet avec les 25 pics est reporté dans la figure 11. Celui-ci et les spectres de masse correspondant à chacun des pics sont annexés à l'annexe 1 du classeur des annexes²².

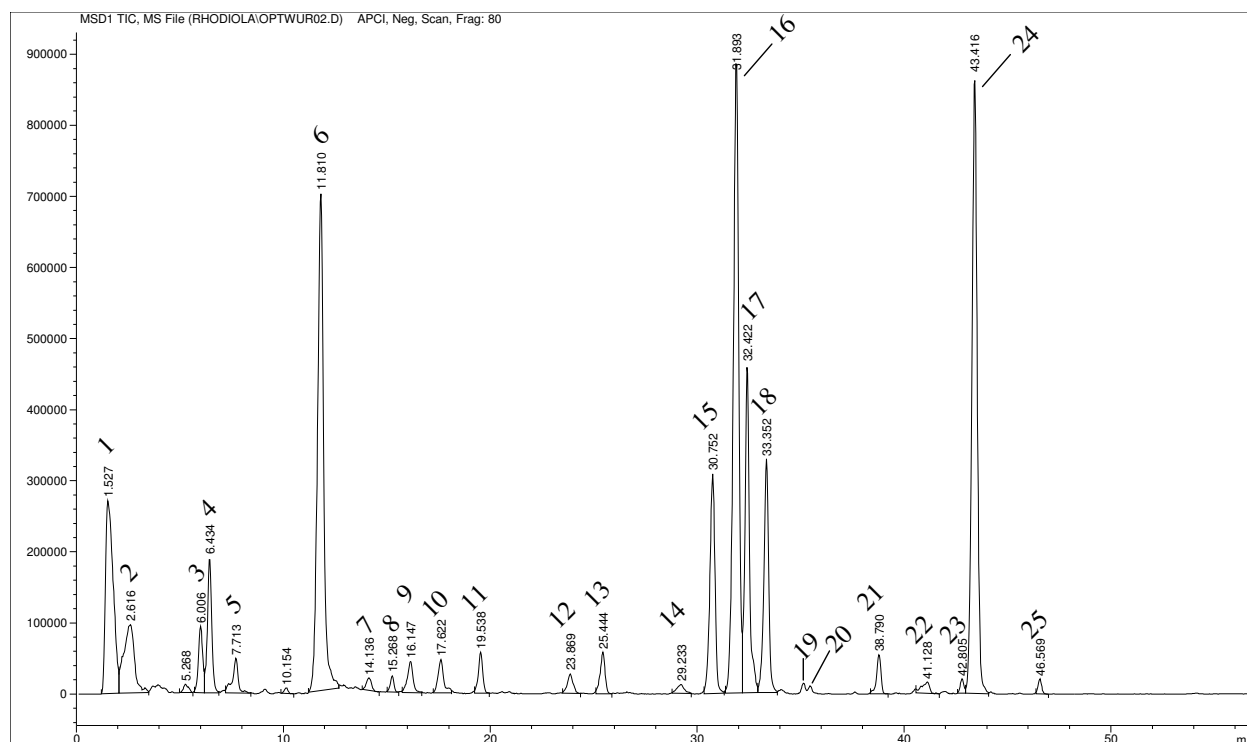


Figure 11: Chromatogramme MS complet de WuMa 1.1 avec les 25 pics à identifier

Les 4 pics identifiés avec certitude sont le n° 6, 15, 16 et 17.

Le pic n°6 à été identifié comme étant de la salidroside. Ceci a été confirmé au court du travail avec l'utilisation de standard. Le spectre de masse à interpréter est reporté dans la figure 12 ci-dessous

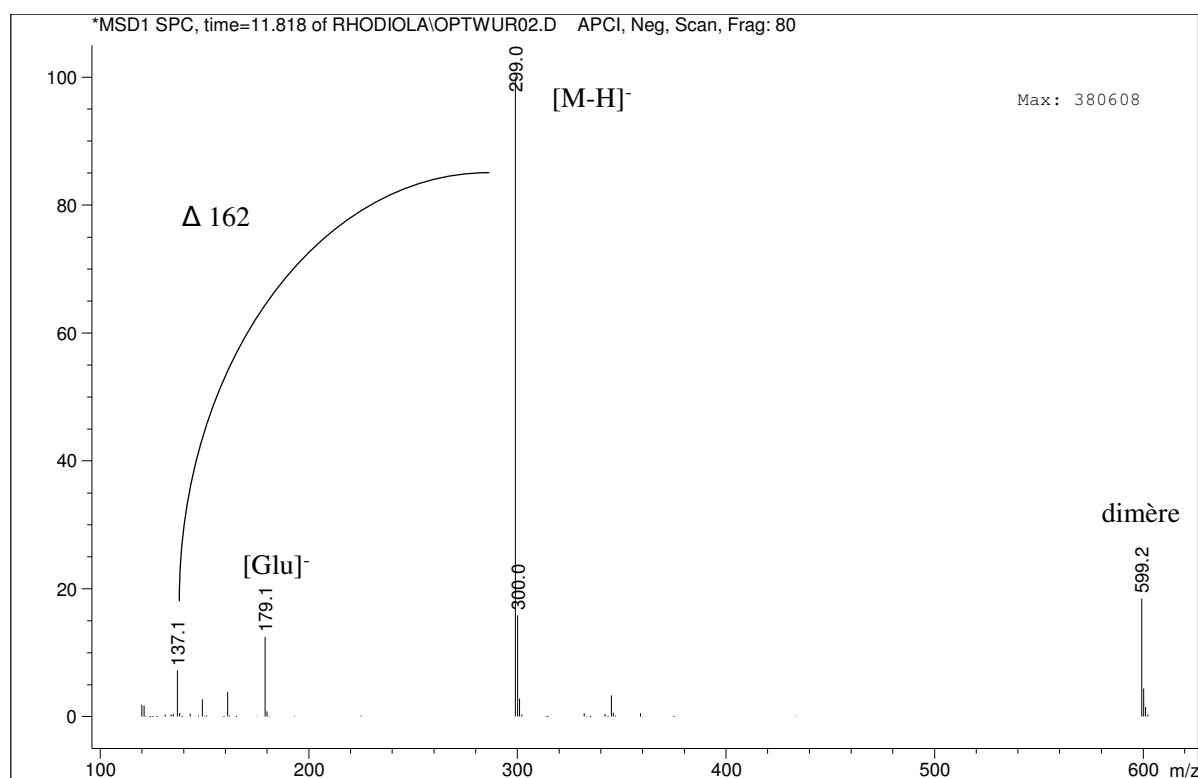


Figure 12: Spectre de masse du pic n°6

Sur ce spectre on voit le pic moléculaire $[M-H]^-$ du salidroside à 299 ainsi que son dimère à 599. La différence de 162 correspond à la « perte » du sucre. Ce sucre se retrouve sous la forme du pic à 179. Les fragments retrouvés sur ce spectre correspondent aux fragments mentionnés par A. Tolonen et al.⁹.

Pour les pics 15,16 et 17 il s'agit de molécules avec la masse molaire 428g/mol qui ne se différencient que par leurs sucres et leur conformation. De se fait les trois composés fournissent les mêmes fragmentations sur les spectres de masse. L'identification définitive s'est effectuée par utilisation de la rosavine comme standard et par l'ordre d'élution des trois substances mentionné par A. Tolonen et al.⁹. L'application de l'ordre d'élution se justifie par le fait que le mélange de solvant reste le même, seuls les temps de rétention changent. Pour les pics 15,16 et 17 seul un tableau récapitulatif est reporté.

Tableau 10: Aperçu des pics trouvés sur les spectres de masse 428-1, 428-2, 17-2 ²²

pic	nom du spectre annexe 1	nom de la molécule	$[M-H]^-$	$[M+HCOO]^-$	$[M+OAc]^-$	$[M-H-AglOH]^-$	$[ara/xyl]^-$	$[M+MeOH]^-$
15	428-1	rosarine	427	473	487	293	149	460
16	428-2	rosavine	427	473		293	149	460
17	17-2	cinnamyle-gly *	427	473		293		460

* cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside

Le pic n°17 est un pic à multiples composés. En extrayant de façon informatique le ion recherché ($[M-H]^-$ 427) l'appareil nous montre que le pic recherché du cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside est caché dans le pic 17 du chromatogramme MS. Ceci est illustré dans la figure 13.

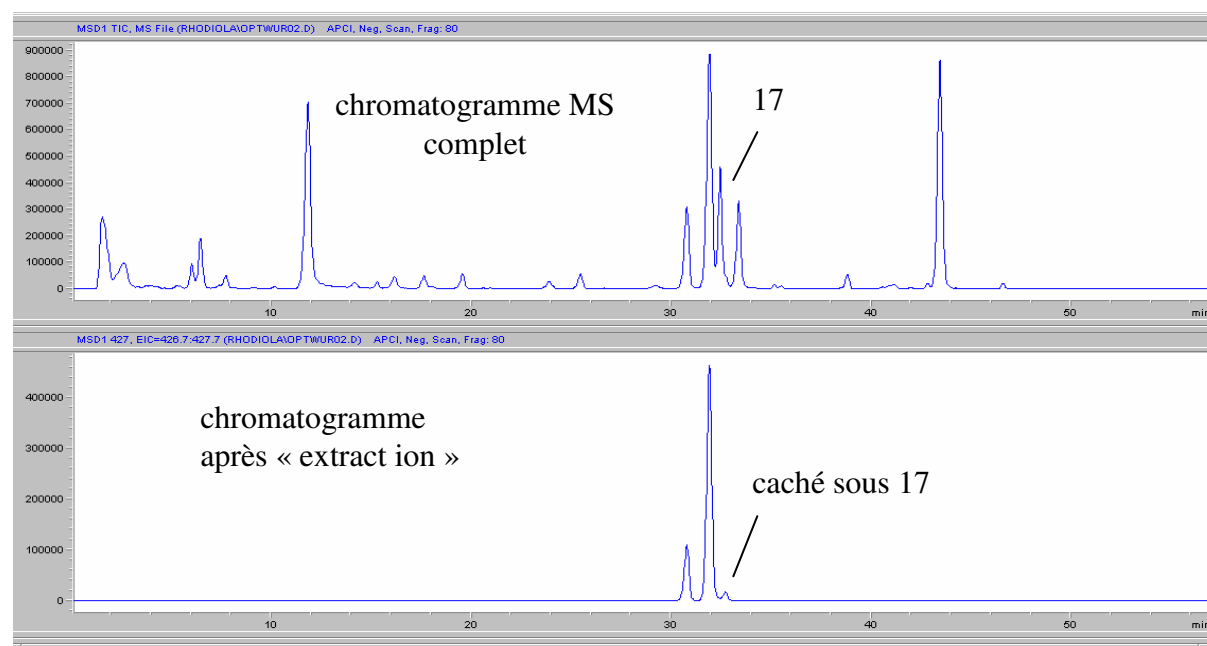


Figure 13: Chromatogramme MS complet (haut) et chromatogramme résultant en utilisant la fonction « extract ion » sur le chromatographe (en bas)

L'APCI est une ionisation du type « soft », c'est-à-dire qu'elle ne favorise pas la fragmentation et qu'on voit très souvent le pic moléculaire. C'est sur ces pics moléculaires que l'identification s'est concentrée. En utilisant la fonction « extract ion » on a essayé de retrouver les composés déjà connus mais ceci n'a pas marché. On ne peut faire que des suppositions et avec une matrice compliquée comme celle des plantes un pic moléculaire ne fait pas encore une identification certaine. De plus une grande partie des pics sont des pics à multiples composés.

Le pic n°2 pourrait être un mélange de rosiridine et rosiridol. Le fait d'obtenir 2 spectres de masse différents du même pic, prêtre à la conclusion qu'il pourrait s'agir de deux substances. On retrouve sur le spectre de masse intitulé 2-2 (cf. annexe 1 du classeur²²) le pic moléculaire du rosiridine $[M-H]^-$ à 331 et un fragment à 169. Le fragment à 169 pourrait correspondre à de la rosiridine sans le sucre (-162) c'est-à-dire à du rosiridol. Dans le spectre de masse 2-1 par contre on trouve un pic à 169 qui pourrait être le pic moléculaire $[M-H]^-$ du rosiridol mais il y a aussi beaucoup de fragments non attribuables (125, 130, 243, 281) qui pourraient correspondre à d'autres substances encore. La théorie faite ci-dessus reste à être vérifiée.

4.3.2. Détermination qualitative de famille de substance par chromatographie sur couche mince

Avec la chromatographie sur couche mince (CCM) la présence de trois familles, à savoir les terpènes, les coumarines et les flavonoïdes, a été recherchée.

Une première étape consiste à trouver un éluant et un révélateur idéal. Les révélateurs standard indiqués dans la littérature²¹ ont été utilisés. Ceux-ci sont le réactif selon Neu pour les coumarines et flavonoïdes et le réactif à base de vanilline et d'acide sulfurique pour les terpènes. Les révélateurs se sont montrés idéales et n'ont jamais changé. Pour les terpènes plusieurs éluant ont été testés. Un premier essai s'est effectué avec l'éluant standard pour les huiles essentielles²¹, c'est-à-dire du toluène/acétate d'éthyle 93 :7. Avec cet éluant aucune séparation n'est observée. La même chose est valable pour l'élution avec l'éluant des flavonoïdes/acides phénoliques²¹, c'est-à-dire de l'acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau 100 :11 :11 :27. Un dernier essai à été fait avec un éluant fait pour la séparation de colorants cinnamoyles²¹. Avec cet éluant (chloroforme/éthanol/acide acétique 94 :5 :1) une séparation et élution idéale est atteinte. Pour les coumarines l'éluant standard (toluène/éther 1 :1 (saturé à l'acide acétique))²¹ à été testé dans un premier essai. Il y avait une mauvaise élution et de ce fait une mauvaise séparation. Puisque l'éluant utilisé pour les flavonoïdes/acide phénolique marchait tout aussi bien pour les coumarines, les 2 familles ont été déterminées avec la méthode décrite au point 3.4.4.

Les chromatogrammes CCM obtenu avec les méthodes idéales sont reportés à l'annexe 15 du classeur des annexes²².

À première vue il n'y a pas de différences flagrantes entre les extraits aqueux des différentes plantes. Il y a juste la racine du Mattmark qui donne un chromatogramme un tout petit peu différent.

En regardant les chromatogrammes des extraits aqueux, on peut dire que dans le rhizome et la racine, les terpènes sont présents en quantité non négligeable car même en appliquant des extraits dilués on peut encore voir des spots. On peut aussi dire qu'il y a plus de terpène que de coumarine car si on applique les extraits dilués on ne voit rien sur le chromatogramme des coumarines/flavonoïdes. On peut aussi constater que dans les racines/rhizomes il n'y a pas de flavonoïdes. Les spots orange caractéristiques manquent. Les coumarines (spot bleu foncé) et les acides phénoliques (spot bleu clair fluorescent) sont bel et bien présents.

A priori les extraits hydro alcooliques montrent la même composition que les extraits aqueux.

4.3.3. Quantification des principes actifs

La quantification des 4 principes actifs identifiés c'est fait de deux manières différentes. Une fois la quantification a été faite avec des standards à chromophores identiques et une fois avec les standards originaux de la plante. Des courbes de calibration à 5 points ont été faites. Si l'on fait la quantification par substance à chromophores identiques il faut faire une correction de masse molaire et supposer que les coefficients d'extinction molaires (ϵ) soit identiques pour travailler avec la courbe de calibration effectuée.

Pour pouvoir déterminer l'efficacité de l'extraction aqueuse, des extractions hydro alcoolique (30% éthanol) on été effectuées comme moyen de comparaison.

L'industrie ne travaille pas avec l'extraction par solvants accélérés. C'est pourquoi après avoir déterminé l'efficacité de l'extraction aqueuse, une macération avec environ 100g de plante (97.528g de WuMa Sep06) a été effectuée, afin de déterminer si l'extraction à l'eau à température ambiante et sans pression reste efficace.

Pour effectuer les calculs de quantification, l'aire du pic à 250nm (rosavine, rosarine, cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside) et l'aire du pic à 220nm (salidroside) sont utilisés. Du à une perturbation de la ligne de base sur les chromatogrammes l'intégration de l'aire du pic s'est faite manuellement. Ceci conduit à une erreur systématique ainsi qu'à une erreur partiellement aléatoire.

La matière sèche de la racine du Mattmark cueillie en septembre (WuMa Sep06) a été oubliée d'être effectuée. Pour calculer les teneurs en principes actifs, la matière sèche de la racine du Mattmark analysée auparavant, a été utilisée. Les résultats concernant la racine WuMa Sep06 doivent être considérés comme indicatif.

Comparaison des deux méthodes de quantification

Pour la quantification de la salidroside, le p-tyrosol (chromophore identique) et la salidroside ont été utilisés comme standard de quantification. Pour la rosarine, la rosavine et le cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside, l'alcool cinnamylique (chromophore identique) et la rosavine ont été employés.

La comparaison, à l'exemple de la teneur en rosavine, est reportée sous forme graphique dans la figure 14. Les diagrammes pour les autres substances sont disponibles à l'annexe 9 du classeur d'annexe²².

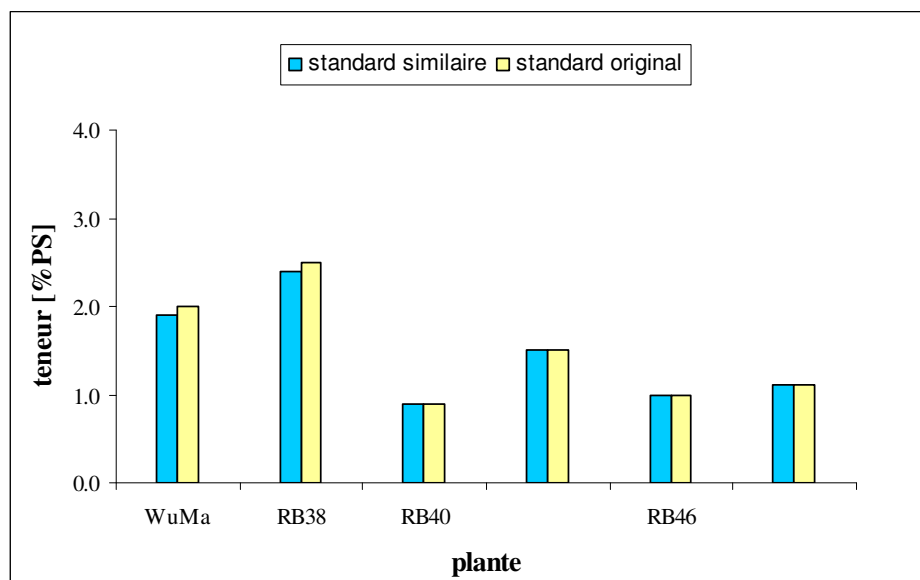


Figure 14: Comparaison de la teneur en rosavine en fonction du standard de quantification

Puisque qu'une très faible différence peut être observée entre les modes de quantification on peut en conclure que pour le future il n'y a plus forcément besoin de standards très chères pour pouvoir quantifier les 4 principes actifs mentionnés.

Dans la suite du rapport les teneurs en principes actifs, quantifiés avec les standards originaux, sont employés.

Comparaison des deux solvants d'extraction

Pour comparer les deux solvants d'extraction la quantification du salidroside n'est pas prise en compte. La quantification du salidroside dans les extraits hydro alcooliques n'est pas possible car le solvant des échantillons possède une plus grande force éluante que l'éluant utilisé. Ceci conduit à un étalement et dédoublement du pic et rend la quantification impossible.

La comparaison pour la racine du Mattmark n'a pas été possible du à un manque de matériel à disposition.

Si les deux solvants d'extraction « fonctionne » bien, il faudrait obtenir la même teneur en principes actifs pour les deux solvants. La comparaison, à l'exemple de la teneur en rosavine, est reportée sous forme graphique dans la figure 15. Les diagrammes pour les autres substances sont disponibles à l'annexe 10 du classeur d'annexe²².

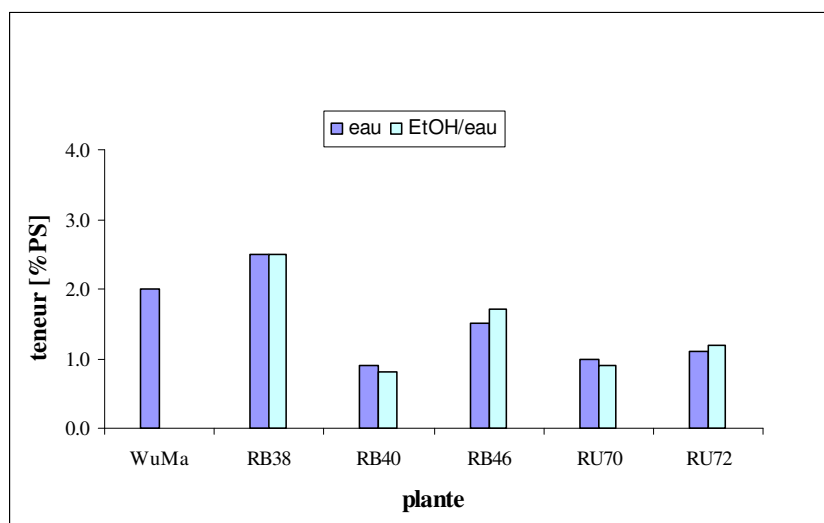


Figure 15: Comparaison de la teneur en rosavine en fonction du solvant d'extraction

Ici aussi les variations sont faibles et se retrouvent dans la marge d'erreur commise par l'intégration manuelle. On peut donc dire que les deux extractions fonctionnent bien.

Un deuxième critère de comparaison entre l'extraction aqueuse et l'extraction hydro alcoolique est le taux de recouvrement après une extraction. Pour quantifier un principe actif, un épuisement est effectué. Ceci veut dire qu'une cellule d'extraction est extraite 3 fois de suite. On suit la teneur de chaque extrait en considération de sa matière sèche et en faisant un calcul fictif on peut déterminer la teneur totale ainsi que le nombre d'extraction théoriquement nécessaire pour sortir le 100%. Dans l'industrie une seule extraction est effectuée, il est donc important que durant la première extraction le maximum de principe actif soit extrait. Pour qu'un procédé soit perçu comme intéressant industriellement, le 80% doit être extrait durant la première extraction.

La comparaison, à l'exemple du taux de recouvrement de la rosavine, est reportée sous forme graphique dans la figure 16. Les diagrammes pour les autres substances sont disponibles à l'annexe 10 du classeur d'annexe²².

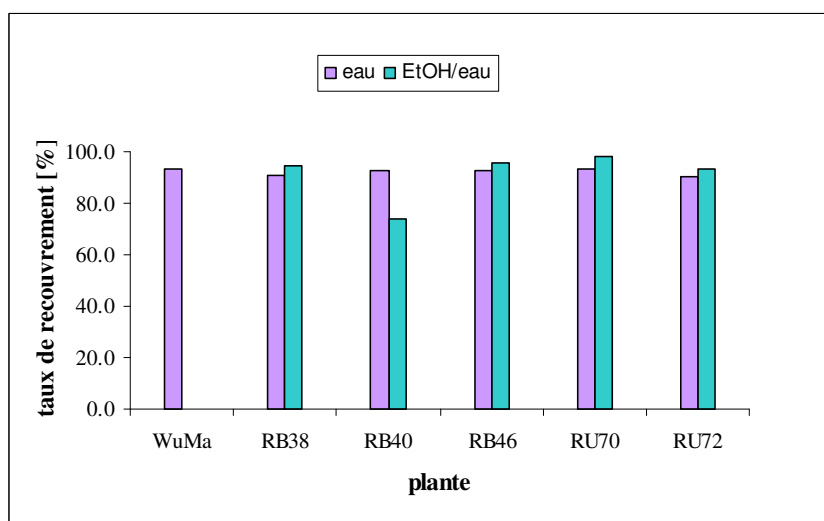


Figure 16: Comparaison du taux de recouvrement après 1 extraction de la rosavine en fonction du solvant d'extraction

On peut observer que l'extraction hydro alcoolique semble apporter une faible amélioration du taux de recouvrement mais puisque toutes les valeurs obtenues sont largement supérieures à 80% l'extraction à l'eau est toute aussi bonne et peut être considéré comme intéressante par l'industrie. Seul le taux de recouvrement à l'extraction hydro alcoolique du RB40 est faible. Cette valeur peut être considérée comme aberrante car l'extraction par solvants accélérés est soumise à de forte variation. C'est pourquoi il faudrait effectuer toute mesure à triple si possible.

Teneur en principes actifs des extractions par solvants accélérés

Le détail des résultats peut être consulté aux annexes 4, 5, 7, et 8 dans le classeur d'annexes²². Ici, seul un tableau récapitulatif de la teneur des 4 principes actifs, quantifiés par les standards originaux (salidroside est rosavine) et extrait à l'eau, est reporté.

Tableau 11: Aperçu des teneurs en principes actifs des différentes plantes

plante	teneur en salidroside [%PS]	teneur en rosarine [% PS]	teneur en rosavine [%PS]	teneur en cinnamyl-gly * [ppmPS]
WuMa	3.5	0.6	2.0	420
WuMa Sep06	3.4	0.5	1.2	480
RB38	0.6	0.7	2.5	610
RB40	2.4	0.2	0.9	240
RB46	0.1	0.4	1.5	380
RU70	2.2	0.2	1.0	230
RU72	0.4	0.3	1.1	250

* cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside

Le tableau 11 ci-dessus est reporté sous forme graphique dans la figure 17.

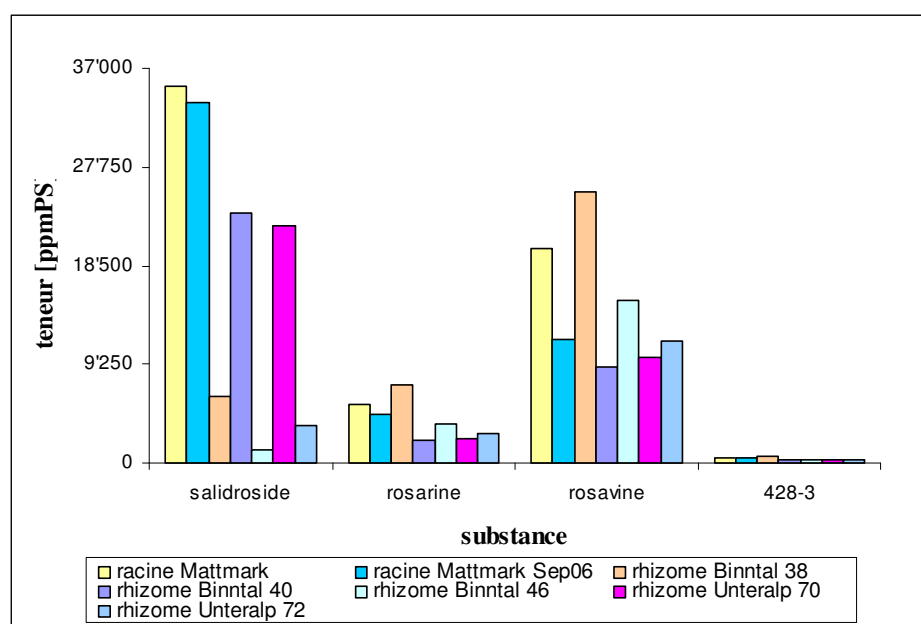


Figure 17: Comparaison de la teneur des 4 principes actifs des extraits aqueux des 7 plantes différentes

On constate que la teneur maximale en salidroside se trouve dans la racine du Mattmark. La teneur maximal en rosarine, rosavine et cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside se trouve dans le rhizome du Binntal 38. Si on classe les teneurs dans leur ordre croissant celui-ci reste toujours le même sauf pour la salidroside. Ce fait montre que la biosynthèse du salidroside est différente de celle des trois autres substances. Si l'on regarde la structure des molécules, cette constatation n'a rien d'étonnant. On peut aussi observer que la racine du Mattmark est la seule plante à avoir une teneur assez élevée de chaque substance. Les rhizomes RB40, RB46, RU70 et RU72 ne montrent pas de quantité élevée en principe actif. On peut donc dire que la provenance de la plante possède une influence importante sur la teneur en principes actifs. Pour vérifier la justesse de cette constatation on effectue une analyse de variance selon Anova. Celle-ci permet entre autre de « mesurer » l'influence d'un paramètre. Dans ce cas les paramètres étudiés sont le solvant d'extraction (A), la molécule de principe actif (B) et la provenance du rhizome (C). L'analyse de variance peut être consultée à l'annexe 12 du classeur d'annexes²².

L'analyse de variance prouve qu'il y a une variation significative de la composition chimique des rhizomes en fonction de la provenance (effet mixte molécule/rhizome).

Puisque les teneurs en principes actifs varient fortement selon la molécule, il faut soit travailler en relatif ou bien analyser chaque principe individuellement. Il a été choisi de travailler individuellement.

Pour chaque substance appart la salidroside, une analyse de variance selon Anova a été ré effectuée. Celle-ci montre que la provenance possède une influence mais que le solvant d'extraction n'en a aucune. Ce fait permet d'établir une localisation (teneur moyenne). Avec cette localisation un test de comparaison selon student a été fait. Celui-ci détermine avec un niveau de confiance de 95% si deux localisations font partie de la même distribution. En d'autres mots, si les plantes se différencient. Le résultat de la comparaison selon student est reporté ci-dessous. Les teneurs sont classées dans l'ordre croissant.

teneur en salidroside :

RB46 \approx RU72 \approx RB38 < RU70 \approx RB40 < WuMa

teneur en rosarine :

RB40 \approx RU70 \approx RU72 < RB46 < WuMa < RB38

teneur en rosavine :

RB40 \approx RU70 \approx RU72 < RB46 < WuMa < RB38

teneur en cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside :

RB40 \approx RU70 \approx RU72 < RB46 \approx WuMa < RB38

Appart pour la salidroside le résultat est toujours le même. Les rhizomes RB40, RU70 et RU72 ne se différencient pas. La plante la plus intéressante à cultiver semble être celle du Mattmark ou bien encore celle du Binntal 38.

4.3.4. Macération

Durant la macération une cinétique sur les 4 principes actifs a été effectuée. Les résultats détaillés sont disponibles à l'annexe 11 du classeur d'annexes²². La cinétique de la rosarine est reportée dans la figure 18 ci-dessous.

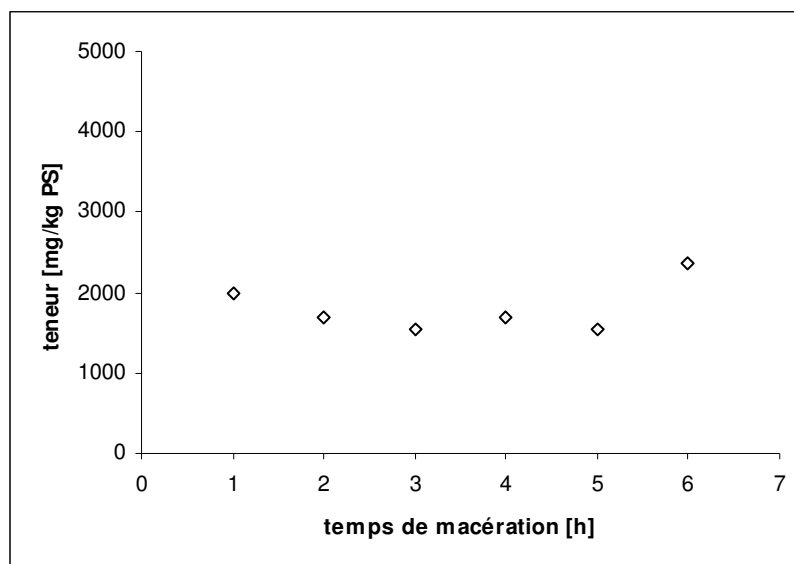


Figure 18: Cinétique de la teneur en rosarine durant la macération

Sur le graphique de la figure 10 on peut observer qu'il n'y a pas d'augmentation ni de baisse en teneur significative. Seul le dernier point est plus élevé mais ceci n'a rien d'étonnant puisque qu'il s'agit de l'extrait après le pressage du marc. En pressant le marc on sort le maximum de principe actif. Ces observations sont correctes pour tous les principes sauf la rosavine. Chez celle-ci on observe une forte diminution de la teneur (c.f. figure 19)

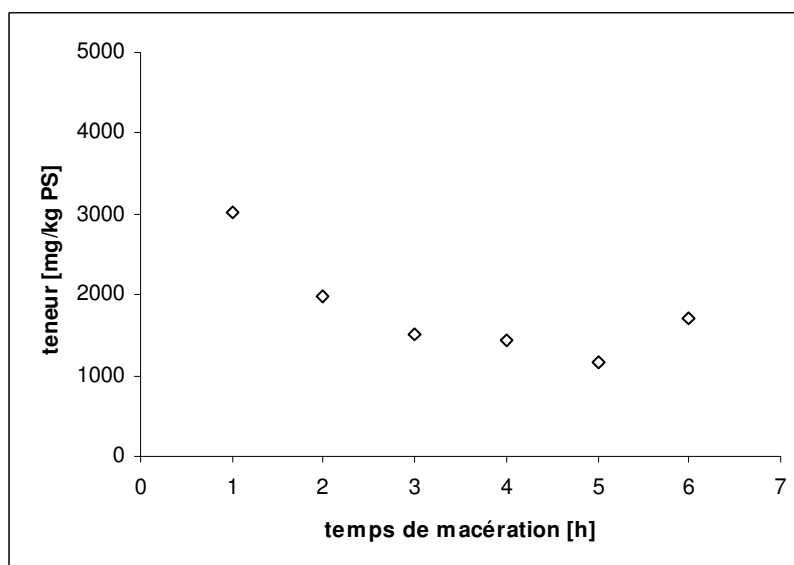


Figure 19: Cinétique de la teneur en rosavine durant la macération

Puisque qu'il n'y a pas d'augmentation de la teneur en principe actif et que pour la rosavine il y a même une baisse, on peut conclure qu'une heure d'extraction est amplement suffisante.

Une macération est efficace, si elle arrive à extraire 80% de ce que l'on extrait par ASE. Pour faire ce calcul la teneur à la fin de l'extraction (mac. Ende) a été employée.

Tableau 12: Aperçu des teneurs en principes actifs des différentes plantes

	teneur par macération	teneur par ASE	taux de recouvrement
	[mg/kg PS*]	[mg/kg PS*]	[%]
rosarine	2'360	4'560	52
rosavine	1'700	11'630	15
cinnamyl-gly	200	480	42
salidroside	26'770	33'820	79

* PS : plante sèche

Comme le montre le tableau 12, la macération à l'eau et à température ambiante n'est pas du tout efficace. Seule la salidroside est assez bien extraite avec un taux de recouvrement proche de 80%. Il faudrait donc tester la macération à des températures plus élevées et regarder si les composés sont stables et s'il y a une augmentation du taux de recouvrement. Si ceci n'est pas le cas il faut abandonner l'idée d'eau comme unique solvant et trouver un solvant d'extraction optimal.

4.3.5. Identification de la perturbation sur les chromatogrammes

Comme déjà mentionné auparavant on trouve sur la majorité des chromatogrammes une perturbation de la ligne de base, en d'autres mots il y a une immense « bosse ». Sur les tout premiers chromatogrammes cet effet ne pouvait encore pas être observé c'est pourquoi on a douté de la stabilité des extraits. Et en effet en faisant un test on pouvait voir qu'après une semaine au frigo la perturbation augmentait.

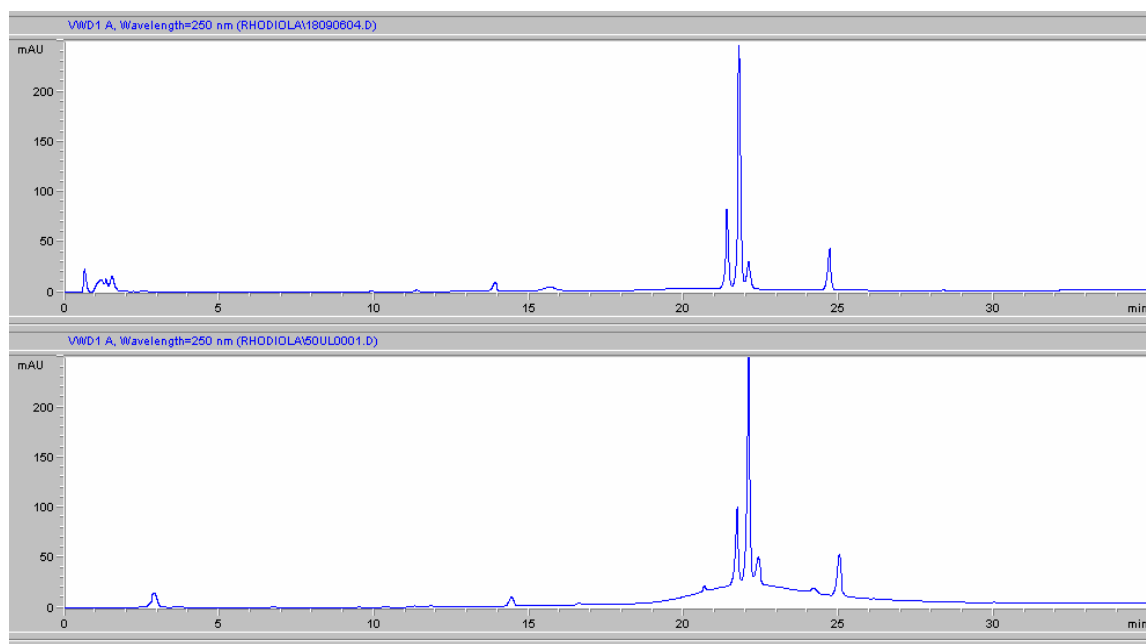


Figure 20: En haut : RB38 1.1.2 En bas : RB38 1.1.2 après 1 semaine au frigo

De ce fait les extraits étaient dorénavant stockés au congélateur. Mais au final, même sur ces chromatogrammes ainsi que sur ceux d'extraits fraîchement extraits la perturbation était présente. La présence de la perturbation n'est donc pas seulement connectée à l'âge de l'extrait.

Des substances connues pour conduire à ce genre de perturbation, sont les tannins. Ceux-ci forment facilement des oligomères dans la plante séchée²³ et de ce fait possèdent énormément de groupes phénoliques (chromophores) qui « perturbent » la mesure. Pour cette raison un dosage de tannins a été fait sur les extraits frais de WuMa Sep06.

Tableau 13: Aperçu des teneurs en principes actifs des différentes plantes

	A ₁	A ₂	A ₃	teneur en tanins
	[-]	[-]	[-]	[% pyrogallol]
WuMa Sep06 1.1	0.931	0.219		14.3
WuMa Sep06 HYA 1.1	1.084	0.441		12.9
WuMa Sep06 mac. Ende	0.390	0.203		3.7
pyrogallol (témoin)			0.312	

Le dosage montre que les extraits ASE de *Rhodiola rosea* sont extrêmement riches en tannins. Ceci explique la forte astringence des extraits et confirme la possibilité que la perturbation soit causée par les tannins.

On peut observer que durant une macération on extrait ≈ 4 fois moins de tannins. Ce fait s'explique par le fait que les tannins se trouvent souvent sous forme oligomère dans la plante sèche²³. Plus une molécule est grosse plus il faut d'énergie pour la mettre en solution. L'énergie est fournie sous forme de chaleur. Il n'est donc pas étonnant qu'à température ambiante (macération) peu de tannins soient extraits comparé à l'ASE (40°C et pression).

Vers la fin du travail (7.11.06) la tête de colonne a été changée. Sur les chromatogrammes on observe une forte diminution de la perturbation. Il se pourrait que les tannins, qui sont de « grosse » molécules, soient retenus sur la pré-colonne tandis qu'avant lorsque la pré-colonne était sursaturée ils passaient sur la colonne et causaient ces perturbations.

Si la perturbation est causée par les tannins il faudrait avoir moins de perturbation sur le chromatogramme de la macération. Une comparaison entre un extrait aqueux obtenu par ASE, un extrait hydro alcoolique obtenu par ASE et un extrait aqueux obtenu par macération est reportée dans la figure 21 ci-dessous.

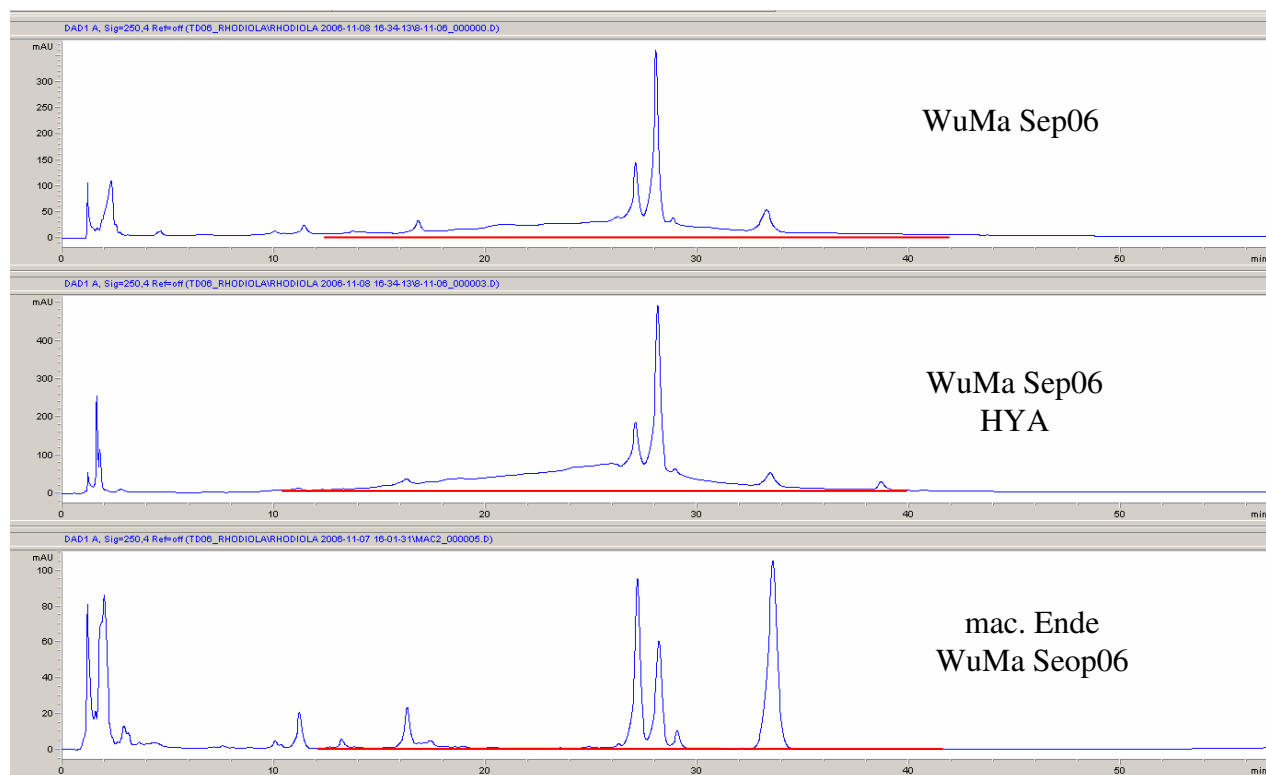


Figure 21: En haut : WuMa Sep06 Au milieu: WuMa Sep06 HYA En bas : mac. Ende

On voit clairement la diminution de la perturbation entre les différents extraits. Aussi la « taille » de la perturbation coïncide avec les teneurs en tannins. En effet l'extrait hydro alcoolique contient le plus de tannins et possède la perturbation la plus prononcée. On peut donc conclure que la perturbation est en effet causée par les tannins.

4.3.6. Observation générale sur les extraits de *Rhodiola rosea*

Sur la plupart des chromatogrammes un pic à ≈ 33 min peut être observé. L'alcool cinnamylique utilisé comme standard possède un temps de rétention de ≈ 33 min. L'idée est donc de déterminer s'il s'agit bien de celui-ci ou bien d'une autre substance. Malheureusement ni l'alcool cinnamylique ni le pic à 33min donne un signal en MS. Il faut donc tenter l'identification à l'aide du spectre obtenu avec le DAD.

Une identification avec certitude n'est possible que sur les chromatogrammes de l'extraction aqueuse et de la macération de la racine du Mattmark cueillie en septembre (WuMa Sep06). Sur tous les autres chromatogrammes l'identité doit être confirmée en effectuant des essais à ajout dosé.

Sur la majorité des chromatogrammes le pic à ≈ 33 min n'est que petit et presque négligeable tandis que sur les chromatogrammes concernant WuMa Sep06 le pic devient important.

En quantifiant l'alcool cinnamylique de la macération et de l'extraction aqueuse de WuMa Sep06 on obtient une teneur de 1050 mg/kg PS par ASE et une teneur de 1250mg/kg PS par macération.

En regardant la structure de l'alcool cinnamylique on peut dire que celui-ci pourrait être un précurseur ou un produit de décomposition de la rosarine, de la rosavine et du cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside.

Puisque durant la macération la teneur en rosavine baisse, mais celle de la rosarine, du cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside et de l'alcool cinnamylique reste la même, on peut dire que la rosavine ne se décompose pas en alcool cinnamylique durant la macération.

Un point qui pourrait indiquer que l'alcool cinnamylique est un produit de décomposition et non un précurseur se trouve dans la comparaison entre les chromatogrammes de WuMa et les chromatogrammes de WuMa Sep06. Sur les chromatogrammes de WuMa on ne trouve quasiment pas de pic à 33min tandis que sur les chromatogrammes de WuMa Sep06 le pic à 33min est important. Par contre la teneur en rosavine est plus faible dans la racine WuMa Sep06 que dans celle cueillie auparavant.

Les deux racines ont été cueillies à un stade de maturation différent. On pourrait donc conclure que plus la plante est cueillie tard plus de rosavine se décompose en alcool cinnamylique. Le fait que les teneurs en rosarine et cinnamyle-(6'-O- β -xylopyranosyle)-O- β -glucopyranoside restent les mêmes laisse fortement douter la conclusion faite auparavant.

Une explication bien plus censée pour la teneur plus basse en rosavine dans la racine cueillie en septembre est le phénomène de la variation chimiotypique. Variation chimiotypique veut dire que la composition chimique de deux plantes voisines peut être complètement différente. Une plante produit beaucoup de rosavine tandis que l'autre n'en produit presque pas.

4.4. Analyse d'extraits de feuilles

La plupart des travaux effectués sur *Rhodiola rosea* portaient toujours sur les racines et le rhizome. Il est donc intéressant de jeter une fois un œil sur les feuilles.

Chromatographie sur couche mince

Comme pour les racines, les extraits de feuilles ont été analysés par CCM pour déterminer quelles familles sont présentes.

En regardant les chromatogrammes obtenus (c.f. annexe 18 dans le classeur des annexes²²), on voit que les terpènes ne sont pas présents dans les feuilles. Ceci explique le fait que l'odeur des extraits n'est pas terrible et complètement différente de celle des extraits de racines. Les extraits de racines ont un peu une odeur de rose due à la présence d'huiles essentielles.

On peut voir que les acides phénoliques et les coumarines sont présents comme dans les racines.

Comparer aux racines on trouve des flavonoïdes dans les extraits de feuilles. Ceux-ci sont représentés par les spots orange.

HPLC-UV/MS

Les extraits de feuilles ont été analysés avec la méthode optimisée (RHOPT50N.M) pour les principes actifs recherchés. Les chromatogrammes correspondants se trouvent à l'annexe 18 dans le classeur d'annexes²².

On peut constater que dans les extraits de feuilles les substances intéressantes (rosarine, rosavine etc.) ne sont pas présentes. De plus on peut voir que sur les chromatogrammes des extraits aqueux, pas beaucoup de pics sont détectés. La plus grande partie des substances présentes éluent tout au début. C'est pourquoi il s'agit de substances polaires. Une identification à l'aide de spectre MS reste impossible.

Dans les chromatogrammes des extraits hydro alcooliques plus de pics sont détectés mais ici aussi une identification reste sans succès. On peut juste dire que les substances sont présentes en plus grandes quantités dans les feuilles d'Unteralp que dans celles du Binntal.

En général on peut dire qu'à première vue les feuilles de *Rhodiola rosea* n'ont rien d'intéressant à offrir et ne sont pas convenables pour l'utilisation dans une boisson.

Quantification de l'acide rosmarinique dans les feuilles

Sur demande de Mme. Malnoë la quantification de l'acide rosmarinique dans les feuilles a été effectué. Les résultats en détails se trouvent à l'annexe 19 du classeur d'annexes²².

Dans les feuilles du Binntal on trouve le pic de l'acide rosmarinique que dans le premier extrait. La teneur en acide rosmarinique est de 1920ppm PS ($\approx 0.2\%$ PS). Dans les feuilles d'Unteralp par contre pas d'acide rosmarinique a été trouvé.

5. Conclusions et perspectives

Quand les extractions sont effectuées par solvants accélérés on ne constate aucune différence entre l'extraction aqueuse et l'extraction hydro alcoolique. Les principes actifs intéressants sont extraits avec les deux méthodes et le taux de recouvrement après une extraction ne diffère pas énormément.

Quant à la macération le taux de recouvrement est très faible et de ce fait pas profitable. Il est donc nécessaire d'optimiser la macération. Il faut faire des tests en augmentant la température de macération et en changeant le rapport plante/eau. Si ceci n'apporte aucune amélioration il faut changer de solvant de macération.

Des différentes plantes analysées, les racines du Mattmark et du Binntal 38 semblent avoir le plus de potentiel d'utilisation par rapport à leur teneur en principes actifs.

Les extraits sont très fortement astringents ce qui est dû à la haute teneur en tannins. Pour la création d'une boisson il est impératif d'ajouter quelque chose de sucré comme par exemple du sirop de sureau (proposé dans le cahier des charges) ou de cassis. Si l'astringence est toujours considérée comme trop élevée, on pourrait essayer de baisser la teneur en tannins en faisant passer l'extrait par une colonne de silice par exemple. Les tannins condensés se fixent sur des protéines acides. La silice étant acide pourrait les retenir. Il faut faire attention à ne pas enlever tous les tannins car ceux-ci sont d'excellents antioxydants et de ce fait de bons agents conservateurs.

Pour faire la boisson il serait peut-être intéressant d'enlever en un premier temps les huiles essentielles par hydrodistillation et en un deuxième temps de faire une macération et obtenir un extrait brut avec les principes actifs à utiliser dans la boisson. À la fin on rajoute à nouveau des huiles essentielles afin d'aromatiser.

Pour de futures expériences il serait peut-être aussi intéressant de trouver un moyen (méthode) de purification des extraits pour pouvoir ajouter à la boisson que les substances désirées.

La méthode d'analyse HPLC/MS doit être optimisée. Un temps d'analyse de 62min n'est pas optimal pour des analyses standard en série.

L'analyse des parties aériennes a montré que l'intérêt à la plante est situé dans les racines et que dans les racines. Aucuns principes actifs identifiés dans les racines ne se sont retrouvés dans les feuilles.

En conclusion on peut dire qu'il reste encore beaucoup de travail à faire mais que *Rhodiola rosea* est une plante avec un potentiel d'utilisation fort intéressant.

6. Bibliographie

1. R.P. Brown, P.L. Gerbarg, Z. Ramazanov; ***Rhodiola rosea*, A Phyto medicinal Overview**; HerbalGram 2002; 56: 40-52
2. http://www.rolv.no/bilder/galleri/medplant/rhod_ros.htm
3. B.J. Hillhouse, D.S. Ming, C.J. French, G.H.N. Towers; **Acetylcholine Esterase Inhibitors in *Rhodiola rosea***; Pharmaceutical Biology 2004; 42 (1): 68-72
4. D.S. Ming et al.; **Bioactive Compounds from *Rhodiola rosea* (Crassulaceae)**; Phytother. Res. 19: 740-743 (2005)
5. F. Capasso, T.S. Gaginella, G. Grandolini, A.A. Izzo ; **Phytotherapy, A Quick Reference to Herbal Medicine** ; Springer Verlag ; 2003; p. 219
6. H. Nörr; **Phytochemische und pharmakologische Untersuchungen der Adaptogendrogen *Eleutherococcus senticosus*, *Ocimum sanctum*, *Codonopsis pilosula*, *Rhodiola rosea* und *Rhodiola crenulata***; Hieronymus Buchproduktions GmbH; München; 1993; p.3; 126-127
7. http://www.shi.se/prod_arcticroot.htm

8. K. Hofstettmann; **Les potentialités de *Rhodiola rosea***; Colloque Valplantes; Septembre 2006
9. A. Tolonen, A. Hohtola, J. Jalonen ; **Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization techniques in the analysis of the main constituents from *Rhodiola rosea* extracts by liquid chromatography/mass spectrometry** ; J. Mass Spectrom. 2003; 38: 845-853
10. A.G. Dubichev, V.A. Kurkin, G.G. Zapesochaya, E.D. Vorontsov; **Chemical Composition of the Rhizome of the *Rhodiola rosea* by the HPLC Method**; Chemistry of Natural Compounds; 27 (2): 161-164 (1991)
11. M.B.C. Gallo et al.; **New Natural Products from *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) and their Chemotaxonomic Significance**; J. Braz. Chem. Soc., 17 (2): 279-288; 2006.
12. Y. Suo et al.; **Analysis of Five Pharmacologically Active Compounds from *Rhodiola* for Natural Product Drug Discovery with Capillary Electrophoresis**; Chromatographia 2004; 60; November (9/10): 589-595
13. A. Petsalo, J. Jalonen, A. Tolonen; **Identification of flavonoids of *Rhodiola rosea* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry**; Journal of Chromatography A; 1112 (2006): 224-231
14. G.S. Kelly; ***Rhodiola rosea*: A Possible Plant Adaptogen**; Alternative Medicine Review; 6 (3): 293-302 (2001)
15. C. Cusumano; **Détermination des procyanidines dans diverses plantes alpines**; HEVs Sion; 2005
16. J. Rohloff; **Volatiles from rhizomes of *Rhodiola rosea* L.**; Phytochemistry 59: 655-661 (2002)
17. V.A. Kurkin et al.; **Phenylpropanoids of a Callus Culture of *Rhodiola rosea***; Chemistry of Natural Compounds; 27 (4): 419-425 (1991)
18. A. Panossian, H. Wagner; **Stimulating Effect of Adaptogens: An Overview with Particular Reference to their Efficacy following Single Dose Administration**; Phytother. Res. 19: 819-838 (2005)
19. Catalogue de produits chimiques Fluka
20. H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer; **Dünnschichtchromatographie, Reagenzien und Nachweismethoden; Band 1a**; VCH Verlagsgesellschaft; Weinheim; 1989, 1990
21. H. Wagner, S. Bladt, E.M. Zgainsky; **Drogenanalyse, Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen**; Springer-Verlag; 1983
22. S. Biner ; **Classeur d'annexes du travail de diplôme 2006, *Rhodiola rosea*** ; HEVs Sion ; 2006
23. J. Bruneton ; **Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales**; 3^{ème} édition; Edition Tec&Doc ; Paris ; 1999